



ugr | Universidad
de Granada

ipbln

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III E INMUNOLOGÍA

PROGRAMA DE BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

*Descifrando las funciones de la proteína adaptadora Numb en el
Sistema Inmunitario: Modulador del desarrollo, adhesión y migración
en timocitos y linfocitos CD8*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADO POR:

Michael G. Caraballo-Toledo

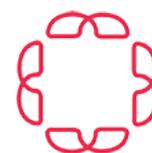
Lcdo. Biología Celular Molecular

BAJO LA DIRECCION DE:

Dra. D^a Matilde Cañelles López

Científico Titular del CSIC

Granada 2016



Sistema Universitario
Ana G. Méndez

Editor: Universidad de Granada. Tesis F octorales

Autor: Michael GilbertCaraballo Toledo

ISBN: 978-84-9125-690-8

URI: <http://hdl.handle.net/10481/43368>



Universidad de Granada



El doctorando...Michael G Caraballo Toledo y los directores de la tesis...Matilde Cañelles López. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

<En Granada > < 13 de noviembre de 2015>

Director/es de la Tesis

Fdo.: Matilde Cañelles López

Doctorando

Michael Caraballo

Fdo.:



“Empiezo a pensar que hay un placer todavía mayor que el ver Granada, y es el de volver a verla.”

Alexandre Dumas. 1846



La música es sinónimo de libertad, de tocar lo que quieras y como quieras, siempre que sea bueno y tenga pasión, que la música sea el alimento del amor.

-Kurt Cobain-

Índice

Contenido

1	INTRODUCCIÓN.....	13
1.1	<u>LINFOPOYESIS Y MADURACIÓN DE LOS LINFOCITOS T EN EL TIMO.....</u>	13
1.2	<u>LA PROTEÍNA ADAPTADORA NUMB.....</u>	16
1.2.1	<i>Estructura y clasificación</i>	16
1.2.2	<i>Mecanismos de Regulación de Numb</i>	19
1.2.3	<i>Funciones de Numb en las células.....</i>	21
1.2.3.1	Numb como proteína endocítica	21
1.2.3.2	Adhesión Celular mediada por Numb	23
1.2.3.3	Papel de Numb en la Migración Celular	23
1.2.3.4	Numb en el desarrollo del Sistema Inmunitario	25
1.3	<u>MIGRACIÓN CELULAR EN EL SISTEMA INMUNITARIO</u>	27
1.3.1	<i>Migración de los Linfocitos</i>	27
1.3.2	<i>Marcadores y Receptores relacionados con la migración de células T del timo a la periferia.....</i>	30
1.3.2.1	Receptor de Células T (TCR).....	30
1.3.2.2	Receptor de Activación Temprana CD69.....	31
1.3.2.3	Receptor de Esfingolípidos 1 (S1P ₁).....	32
1.3.2.4	Receptor de Selectina-L (CD62L).....	32
1.3.2.5	El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)	33
1.3.2.6	Quimioquinas.....	34
1.4	<u>MOLÉCULAS DE ADHESIÓN: INTEGRINAS.....</u>	35
1.4.1	<i>Descripción y Estructura Molecular.....</i>	35
1.4.2	<i>Mecanismos de Regulación de las Integrinas: activación, expresión y afinidad.....</i>	37
1.4.2.1	Activación.....	37
1.4.2.2	Regulación de la Expresión y Afinidad a ligandos.....	39
1.4.3	<i>Funciones de las Integrinas en las células</i>	43
1.4.4	<i>Las Integrinas $\alpha E\beta_7$ (CD103) y $\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1) en timocitos y linfocitos</i>	44
1.4.4.1	TGF- β_1 como modulador de la integrina CD103	47
2	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	52
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
3.1	<u>MATERIALES.....</u>	54
3.1.1	<i>Ratones Utilizados para estudiar la funcionalidad de Numb en el Sistema Inmunitario.....</i>	54
3.1.2	<i>Medios de Cultivo Utilizados.....</i>	55
3.1.2.1	Medio 199 Completo.....	55
3.1.2.2	Medio RPMI 1640 Completo	56
3.1.2.3	Medio de Congelación	56
3.1.3	<i>Tampones y soluciones generales utilizadas.....</i>	56
3.1.4	<i>Reactivos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	57
3.1.5	<i>Reactivos para la Reacción Cuantitativa en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).....</i>	58
3.1.6	<i>Tablas de Oligonucleótidos utilizados.....</i>	58
3.1.6.1	Oligos empleados para el genotipaje de las líneas de ratones transgénicas.....	58
3.1.6.2	Oligos empleados para el análisis del receptor S1P ₁ mediante la técnica de RT-PCR en timocitos	59
3.1.6.3	Parámetros utilizados en el Termociclador para las reacciones de PCR y qRT-PCR	59
3.1.6.3.1	Programa utilizado para PCR convencional	59
3.1.7	<i>Lista de Anticuerpos</i>	60
3.1.7.1	Anticuerpos y Reactivos para inmuno-detecciones de tejidos visualizados por Microscopía Confocal.	60
3.1.7.2	Anticuerpos utilizados para Inmuno-detecciones de Citometría de Flujo	61

3.1.8	<i>Materiales y reactivos para la extracción de linfocitos epiteliales (IEL) del intestino y de la Lamina Propia (LPL)</i>	62
3.1.9	<i>Materiales y reactivos utilizados para prueba de Adhesión celular</i>	62
3.2	MÉTODOS	63
3.2.1	<i>Producción y Mantenimiento de Ratones</i>	63
3.2.1.1	<i>Cruce de Ratones e Identificación de ratones transgénicos</i>	63
3.2.2	<i>Extracción de órganos y células</i>	64
3.2.3	<i>Congelación del Tejido del Timo</i>	65
3.2.4	<i>Inmuno-detecciones en tejidos congelados de Timo para su visualización por Microscopio Confocal</i>	66
3.2.5	<i>Marcaje Celular por Citometría de Flujo para el estudio de sub-poblaciones, receptores y marcadores superficiales</i>	67
3.2.6	<i>Marcaje Intracelular para la detección de la proliferación celular (BrdU) y para los niveles de expresión de proteínas</i>	68
3.2.6.1	<i>Ensayo de proliferación en timocitos y protocolo de tratamiento a ratones</i>	68
3.2.6.2	<i>Ensayo para la detección de niveles de expresión para receptores y proteínas superficiales</i>	69
3.2.7	<i>Estudio de la Modulación de receptores superficiales</i>	70
3.2.7.1	<i>Estudio de la internalización del receptor superficial CD69</i>	70
3.2.8	<i>Extracción de ARN Mensajero y análisis de SIP₁ por RT-qPCR Cuantitativa</i>	70
3.2.9	<i>Estudio de Adhesión celular in vitro a la proteína de la matriz extracelular Colágeno, para los timocitos totales</i> . 71	
3.2.10	<i>Extracción de Linfocitos Intraepiteliales (IEL) y Lamina Propia (LPL) del intestino</i>	72
4	RESULTADOS	76
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DEL DN^{nb} DURANTE EL DESARROLLO DE LOS TIMOCITOS	77
4.1.1	<i>La proliferación celular para la subpoblación CD8SP del timo disminuye ante la inhibición de Numb endógeno</i>	77
4.1.2	<i>La muerte celular en los timocitos totales y simples positivos no se ve afectada por la modulación negativa de Numb</i>	78
4.2	ESTUDIO DE LOS RECEPTORES ASOCIADOS A LA MADURACIÓN CELULAR EN RATONES TG-DN^{nb}	80
4.2.1	<i>Análisis del efecto del dominante negativo de Numb sobre los niveles superficiales de los marcadores de maduración</i>	80
4.2.2	<i>Consecuencias de la expresión de dnNb sobre los receptores de migración y sobre la distribución en la periferia</i>	82
4.2.3	<i>Estudio de la expresión de receptores de esfingolípidos en timocitos totales</i>	85
4.2.4	<i>Receptores de Quimioquinas</i>	86
4.2.5	<i>Análisis de la distribución de linfocitos CD8SP-dnNb con fenotipo mixto en los órganos secundarios</i> . 87	
4.3	DN^{nb} INDUCE UNA ACUMULACIÓN ESPECÍFICA DE TIMOCITOS CD8SP EN EL TIMO	92
4.4	IMPLICACIÓN DE NUMB DURANTE EL PROCESO DE LA ADHESIÓN CELULAR EN TIMOCITOS	95
4.4.1	<i>La adhesión celular de los Timocitos Totales a Colágeno, proteína de la Matriz Extracelular del timo</i> .95	
4.4.2	<i>Numb y la expresión de moléculas de adhesión a la Matriz Extracelular: “Lymphocyte function-associated antigen-1” (LFA-1) y “Very Late Antigen-4” (VLA-4)</i>	96
4.4.3	<i>El dominante negativo para Numb induce una disminución en la integrinas $\alpha\beta 7$ (LPAM-1) y una sobreexpresión en $\alpha E\beta 7$ (CD103)</i>	98
4.5	MODULACIÓN DE LA INTEGRINA CD103 POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF-B) 104	
4.5.1	<i>El Factor de crecimiento TGF-β_1 no induce la sobreexpresión de CD103 en la inhibición de Numb endógena</i>	104
5	DISCUSIÓN	107
6	CONCLUSIONES	123
7	REFERENCIAS	126

RESUMEN

El Sistema Inmunitario es el responsable de defender y mantener al organismo libre de enfermedades, eliminando la presencia de cualquier patógeno en el sistema. Se compone de dos grupos principales de células, las células B y las células T, son las encargadas de mediar la respuesta inmune, eliminando el antígeno mediante la producción de anticuerpos o directamente por células, respectivamente. Su desarrollo o linfopoyesis es un proceso de diferenciación complejo y altamente regulado. El proceso comienza en la médula ósea, siendo los precursores de los linfocitos T los únicos en viajar hasta el timo para su desarrollo. Alteraciones durante alguna de las fases de diferenciación de estos precursores en el timo, comprometerían el desarrollo de los timocitos y linfocitos, y por ende, la integridad del Sistema Inmunitario.

La proteína adaptadora Numb se ha estudiado en múltiples mecanismos celulares, siendo en ocasiones el determinante final del destino de la célula. Gracias a su dominio de unión a fosfotirosina (PTB), tiene la capacidad de interactuar con diferentes receptores y complejos proteicos, modulando su expresión, endocitosis y/o degradación. A pesar de que conocemos muchas de sus funciones, la información sobre la interacción de Numb y el Sistema Inmunitario es muy limitada hasta el momento. Sin embargo, al tener una presencia en las células T y modular diversos grupos celulares, es un candidato para participar en procesos del Sistema Inmunitario.

En esta tesis hemos analizado el papel de Numb durante el desarrollo de los timocitos y funcionalidad de los linfocitos maduros. Para ello, se ha utilizado la alteración de los niveles funcionales de Numb en ratones, bien por expresión de un dominante negativo (dnNb) o sobreexpresión de la proteína completa.

Resumen

Mediante el estudio de ratones TG-dnNb hemos demostrado que la inhibición de Numb resulta en:

- Alteraciones en los niveles superficiales de los marcadores de maduración en los timocitos CD8 simples positivos (SP).
- Una disminución significativa en la capacidad migratoria de la población CD8SP a los órganos periféricos secundarios, especialmente a los nódulos linfáticos.
- Una acumulación específica de la población de timocitos CD8SP en la zona medular del timo.
- Alteraciones en los niveles superficiales de integrinas, con una sobreexpresión de la integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103) en la población CD8 (timocitos y linfocitos).
- Un cambio en el patrón de migración periférica, induciendo un aumento de los linfocitos CD8 intraepiteliales (IEL) en el intestino delgado.

Los resultados descritos en este trabajo sugieren un papel importante de los niveles funcionales de Numb endógena en el desarrollo óptimo de los linfocitos CD8. De igual forma, estos resultados podrían sugerir un nuevo mecanismo de desarrollo en el timo, y la posibilidad de un patrón de migración diferencial para salir del timo entre las poblaciones CD4 y CD8 simples positivas. Este mecanismo, hasta nuestro conocimiento, no está descrito y podría contradecir el modelo vigente.

En resumen, hemos podido demostrar que Numb participa como modulador en el desarrollo de timocitos, principalmente para la población CD8. Los resultados presentados pueden afectar la visión general del funcionamiento del Sistema Inmunitario.

Introducción

1 Introducción

1.1 Linfopoyesis y maduración de los Linfocitos T en el timo

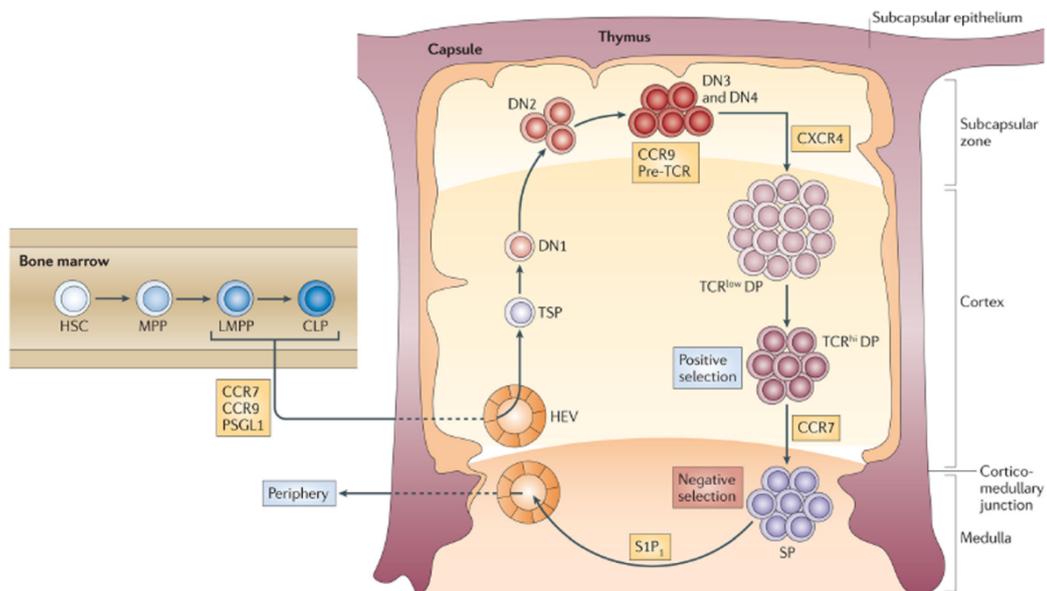
La funcionalidad del Sistema Inmunitario se basa en la presencia de diferentes grupos celulares, entre ellos los linfocitos. Los linfocitos se dividen en dos grandes grupos: Linfocitos T y B, cada uno de los cuales ejerce funciones específicas en las respuestas inmunes. Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea y secretan las diferentes isoformas de anticuerpos, es decir, son los encargados de modular la inmunidad mediada por anticuerpo. Por otro lado, los linfocitos T se desarrollan y maduran en el timo, siendo los responsables de la Inmunidad mediada celularmente.

La linfopoyesis de los Linfocitos T comienza con la migración de sus células progenitoras desde la médula ósea hasta el timo. Los precursores destinados al linaje T son generados en paralelo a los del linaje B, con la diferencia de que los precursores T entran al torrente sanguíneo. Esto les permite llegar hasta el timo, donde se piensa que pierden toda capacidad de poder diferenciarse hacia linaje B (**Fig.1**) [1]. La llegada de estos precursores T ocurre por oleadas, que en ratón duran desde la embriogénesis hasta después del nacimiento [2]. La primera oleada de precursores llega alrededor del día 12 de vida embrionaria (Embryonic day), diferenciándose inmediatamente hacia timocitos. La segunda oleada llega sobre los días embrionarios 19-21, pero no se diferencian hasta 6 o 7 días después del nacimiento. Estas células van a remplazar a la primera oleada de precursores.

El timo es un órgano linfoide de forma bilobulada cuya función es inducir, controlar y mantener el desarrollo de las células T [3]. Estas funciones están facilitadas por su organización estructural y su conformación tridimensional, que resulta en la existencia de diferentes micro-nichos para el desarrollo óptimo de las células T. La organogénesis del timo consiste en interacciones mesénquimo-epiteliales [3], resultantes en la aparición de las células estromales del timo (TEC).

Introducción

La población TEC rellena cada lóbulo del timo con una capa de tejido heterogéneo, formando tres zonas: (i) subcapsular, (ii) cortical y (iii) medular. La estructura tridimensional del timo permite la interacción entre las células que lo forman y los progenitores de las células T, permitiendo así la inducción, vigilancia y dirección correcta del desarrollo de los timocitos, que a su vez son los precursores de los linfocitos T.



▣ **Fig.1 Esquema representativo de la entrada de los progenitores de las células T desde la médula ósea.** Desarrollo de los timocitos por sus diferentes etapas y zonas del timo. Diagrama tomado de “*Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration*” *Nat Rev Immunol.* 2011 Love PE et .al

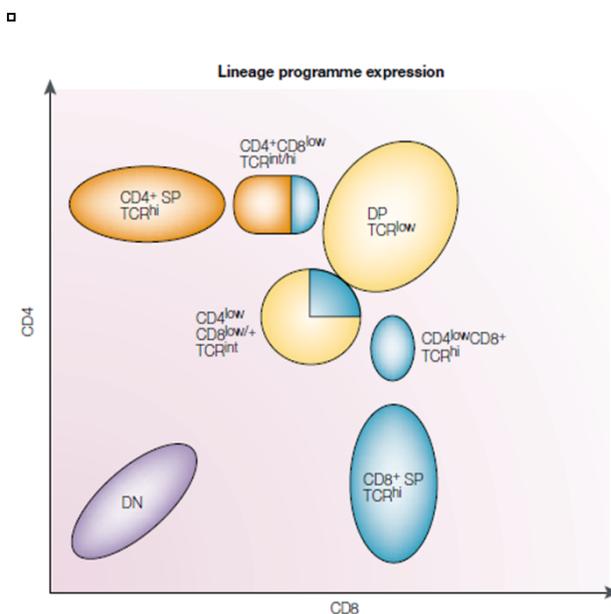
Las diferentes etapas del desarrollo de los timocitos y su localización en el timo han sido estudiadas y descritas detalladamente. En una visión general, el desarrollo de los timocitos se puede dividir en tres fases: (i) timocitos Doble Negativos (DN), (ii) timocitos Doble Positivos (DP), (iii) timocitos Simple Positivos (SP). Estas tres poblaciones pueden ser identificadas fácilmente mediante la expresión de receptores superficiales (**Fig.2**). La población DN se caracteriza por no expresar los receptores CD4 ni CD8 en su superficie, así como por la expresión

superficial de los marcadores CD25 y/o CD44 [1]. Según el patrón de expresión superficial de CD25 y CD44, los timocitos DN pasan por 4 sub-fases: DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺) y DN4 (CD44⁻CD25⁻) (**ver Fig.1**). La transición DN3/DN4 es la sub-fase más importante, ya que en este momento los timocitos proliferan, permitiendo al timo alcanzar su tamaño correcto. También ocurre la señalización a través del precursor del receptor de células T (pre-TCR), facilitando así la transición hacia la etapa DP.

Los timocitos DP expresan simultáneamente los marcadores superficiales CD4 y CD8, constituyendo la población celular mayoritaria del timo. De igual forma, en esta fase expresan el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los MHC son unas glicoproteínas membranales que ejercen como receptores de reconocimiento para las células T. Gracias a estos complejos, los linfocitos T pueden reconocer fragmentos de antígenos (Ag) en las células presentadoras de antígenos (APC). Cada complejo tiene un mecanismo para presentar el Ag, de este modo la respuesta inmune activada dependerá de ese mecanismo. Durante la etapa DP, los timocitos reciben diferentes señalizaciones moleculares para afinar su desarrollo, siendo la selección positiva y la selección negativa los dos mecanismos más importantes. La selección positiva garantiza que los timocitos DP expresen un TCR con la afinidad adecuada hacia los complejos MHC-péptido. Los timocitos que sobreviven a este filtro pueden continuar su desarrollo. Si los timocitos no presentan una afinidad por este complejo, van a morir por falta de estimulación, lo que se conoce como muerte por negligencia. Además, durante la selección positiva, los timocitos son capaces de tomar un linaje específico; CD4 SP o CD8 SP. Esta toma de decisión se basa en una combinación entre el reconocimiento efectuado por los timocitos de los MHC y la señalización por el TCR. De este modo, células que reconozcan el complejo MHC-I se diferenciarán hacia CD8 y si reconocen a MHC-II hacia células CD4.

Introducción

Por el contrario, la Selección Negativa inicia la apoptosis en cualquier timocito que sea capaz de reconocer un péptido propio unido al MHC con excesiva afinidad, como consecuencia del exceso de estimulación. Esto evita la presencia en la periferia de futuros linfocitos auto-reactivos. Sólo los timocitos que logran superar esta diferenciación funcional son óptimos para avanzar y completar la siguiente fase de desarrollo, conocida como timocitos SP. Finalmente, estos timocitos SP se convierten en células maduras y pueden migrar del timo a la periferia.



□ **Fig.2 Identificación de las poblaciones y sub-poblaciones de timocitos.** Esquema representativo de los timocitos identificadas por citometría de flujo. Diagrama sacado de “*T-cell Development and the CD4-CD8 Lineage decision*” *Nat Rev Immunol.* 2000 Germain RN. et al.

1.2 La proteína adaptadora Numb

1.2.1 Estructura y clasificación

Numb es una proteína adaptadora evolutivamente conservada, descrita por primera vez como mediador del proceso de determinación de linaje en células del sistema nervioso en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (dNumb),

actuando como proteína inhibidora de la ruta de señalización de Notch [3, 4]. Las proteínas adaptadoras son mediadores críticos entre los receptores y las cascadas de señalización, y funcionan como puentes entre moléculas que modulan una o varias cascadas.

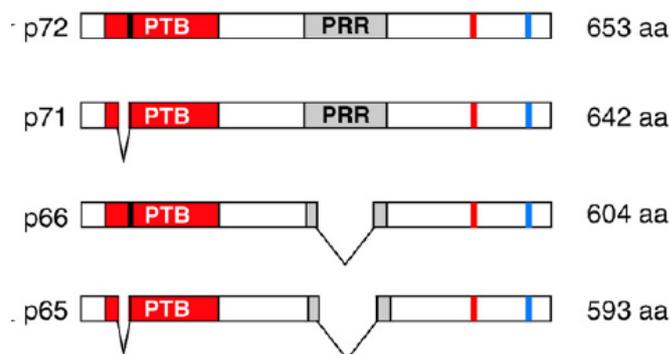
Numb posee en su extremo amino-terminal un dominio de unión a fosfotirosina (PTB), característica que le aporta la funcionalidad de proteína adaptadora. Por otro lado, su extremo carboxi-terminal es más complejo, dividiéndose en: una zona rica en prolina (PRR), lugares de unión para dominios de homología SH3 y dos motivos altamente conservados: (i) el motivo DPF, formado por los aminoácidos ácido aspártico-prolina-fenilalanina y (ii) el motivo NPF, formado por los aminoácidos: asparagina-prolina-fenilalanina [5, 6]. El motivo NPF le permite la unión a los dominios homólogos de Eps15 (dominios EH). Esta combinación de dominios y motivos le confiere a Numb gran capacidad para interactuar con diversas proteínas, permitiéndole un amplio rango de funciones.

En *Drosophila*, dNumb es responsable de que los precursores de los órganos sensoriales (SOP, siglas en inglés) decidan entre un fenotipo de diferenciación o de proliferación. Este fenómeno se produce como resultado de la división asimétrica, proceso por el cual únicamente una de las dos células producidas tras la división celular hereda dNumb. Como resultado de la división asimétrica se obtienen dos poblaciones diferentes, una de las cuales permanece en estado de proliferación, importante para completar las etapas de desarrollo temprano. Mientras tanto, la otra población empieza a diferenciarse hacia células específicas del órgano/tejido a poblar. De igual forma, se ha descrito la presencia de Numb en mamíferos (mNumb) simultáneamente con un homólogo conocido como Numb-like (Numbl) [5, 6]. Estos homólogos en mamíferos realizan funciones similares a dNumb, como por ejemplo la toma de decisiones de diferenciación del sistema nervioso [5, 6].

A diferencia de *Drosophila*, donde sólo existe una isoforma de Numb, en mamíferos se han identificado 4 isoformas distintas de Numb: p65, p66, p71 y p72

Introducción

(Fig.3). Estas isoformas son formadas a consecuencia del proceso de empalme alternativo (*alternative splicing domains*) [5, 6]. Las cuatro isoformas difieren en cuanto a su peso molecular, como resultado de la presencia o ausencia de secuencias adicionales de amino ácidos dentro de la proteína. Las isoformas p72 y p66 poseen una secuencia de 11 aminoácidos en la región del PTB (PTBi), ausente en las otras dos isoformas, mientras que las isoformas p71 y p72 contienen una secuencia de 49 aminoácidos en la región central de la proteína, (región PRR; PRRi). Así, la isoforma p72 es la única que posee ambas secuencias adicionales y p65 es la única sin expresar secuencias adicionales. Se ha demostrado que las secuencias PTBi y PRRi puede determinar la localización de Numb en las células. Las isoformas con PTBi adquieren la capacidad para unirse a la membrana plasmática, mientras las isoformas PRRi se encuentran en el citoplasma o en el núcleo [5, 6].



▣ **Fig.3 Estructura de las 4 isoformas de Numb expresadas en mamíferos.** La secuencia PTBi está representada con el cuadro negro dentro del dominio PTB y la secuencia PRRi con el cuadro gris en el extremo carboxil-terminal. Diagrama sacado de *Characterization of four Mammalian Numb protein Isoforms. J Biol Chem. 1999 Dho SE et. al.*

Estudios realizados en las últimas décadas sobre el PTB han identificado variaciones estructurales que determinan diferentes funciones de los dominios PTB. Todos los dominios PTB descienden de un ancestro en común en la proteína Shc, el cual adopta una conformación estructural similar a los dominios de homología Pleckstrin (PH domain).

Existen dos subgrupos de PTBs: (i) PTBs dependientes de fosforilación en el residuo de tirosina (familia IRS-like) y (ii) PTBs independientes de fosforilación (familia Dab-like) [7]. Las proteínas que poseen un PTB tienen su propia clasificación y se dividen a su vez en 3 familias, según la relación función/estructura que exhiban. Estas familias se denominan: (i) dependiente de fosforilación Shc-like, (ii) dependiente de fosforilación IRS-like y (iii) no dependiente de fosforilación Dab-like. Numb es una proteína adaptadora que pertenece al subgrupo de PTB independiente de fosforilación y a la familia Dab-like, según su relación función/estructura [7].

El lugar de unión en los PTBs, conocido como “*peptide binding pocket*”, exhibe una conformación de lámina plegada (β -turns), dicha conformación le permite reconocer y unirse a la secuencia de amino ácido Asparagina-Prolina-X-Tirosina (NPxY), en las proteínas. A esta secuencia (donde X puede estar ocupado por cualquier aminoácido) se conoce como la secuencia canónica de unión de los dominios PTB. Esta conformación en lámina plegada permite que el residuo de tirosina esté más cerca del “*peptide binding pocket*”, provocando que la energía de esta unión (*highly basic charged anchoring pocket*) sea óptima. Más aún, ciertas modificaciones en la secuencia NPxY se han identificado como reguladores en la interacción con los PTB. Una de las modificaciones claves en la secuencia NPxY es la fosforilación del residuo tirosina. A través de esta fosforilación se puede inducir un aumento o una inhibición en la interacción PTB-NPxY.

1.2.2 Mecanismos de Regulación de Numb

Como es de esperar, una proteína adaptadora con una estructura tan compleja y con la capacidad para interactuar con diversas proteínas, ha de tener una actividad regulada a diferentes niveles. Por ejemplo, a nivel de ARN mensajero Numb está

Introducción

regulado por los inhibidores Musashi-1 y miR146a [5]. Además, existen modificaciones pos-traduccionales que son capaces de alterar el comportamiento de Numb.

La regulación más estudiada y mejor descrita para Numb hasta el momento, es su fosforilación y defosforilación en el extremo carboxi-terminal. La fosforilación de Numb esta llevada a cabo por diferentes quinasas, entre las que se encuentran: Quinasas dependientes de Ca^{2+} /Calmodulina (CaMK1) con una fosforilación en el residuo de Serina [8], la quinasa atípica PKC (aPKC) (8), la quinasa asociada a Numb (NAK) que también fosforila en serina y treonina [4] y en humanos es fosforilada por la quinasa “Associated Kinase 1” (AAK1) [9]. Estas quinasas modulan tanto la funcionalidad de Numb como su localización dentro de la célula.

La fosforilación mediada por las proteínas G acopladas a receptores (GPCR), induce un cambio en la sub-localización de Numb, de la membrana plasmática hacia el citosol [10]. La quinasa aPKC, por su parte, provoca un cambio de localización de Numb, llevándola desde las vesículas endocíticas cubiertas de clatrina (*Clathrin-coated structures-CCSs*) hasta el citoplasma y viceversa. Esta fosforilación tiene como consecuencia que Numb pierde su capacidad para unirse a la proteína PAR3 y a α -adaptin, induciendo una separación entre la interacción Numb-vesícula endocítica [11]. Mientras tanto, cuando Numb no es fosforilado permanece unido a las CCSs, inhibiendo la internalización de proteínas o complejos que utilizan este mecanismo, como por ejemplo las integrinas.

Por ende, su fosforilación induce una separación de Numb de las CCSs, permitiendo la internalización de integrinas [11, 12]. Otras sub-localizaciones donde se ha identificado a Numb han sido: los endosomas de reciclaje Rab4 y Rab11 (reciclaje de receptores, complejos, integrinas entre otros), compartimiento endosomal de reciclaje y aparato trans Golgi [9, 12].

1.2.3 Funciones de Numb en las células

Como se ha mencionado anteriormente, las secuencias PTB y PRR, junto con otros dominios y motivos de su estructura, le permiten a Numb diferentes localizaciones intracelulares (membrana celular, citosol, maquinaria intracelular etc.), un amplio rango de posibilidades para interactuar y participar en diferentes procesos celulares. Además de su función fundamental como inhibidor de Notch durante la división asimétrica (dNumb y mNumb), se le han adjudicado funciones celulares adicionales. Estas funciones van relacionadas con el crecimiento celular, ubiquitinación, degradación proteolítica, tumorigénesis, endocitosis, adhesión, y migración celular [5]. Ello brinda a Numb irrefutable importancia en los procesos más comunes que llevan a cabo las células.

Estas funciones de Numb van ligadas al reconocimiento de su dominio PTB, el cual reconoce preferiblemente secuencias de unión del tipo NPxY. Hay evidencia de que los dominios PTB pueden reconocer ocasionalmente secuencias diferentes a NPxY, mostrando una gran versatilidad para reconocer proteínas y complejos moleculares. A continuación se discutirán las más relevantes a esta investigación.

1.2.3.1 Numb como proteína endocítica

La principal función que caracteriza a Numb es la internalización de los complejos moleculares llevada a cabo mediante endocitosis. Uno de los mecanismos de endocitosis más comunes es el realizado por las vesículas recubiertas de clatrina. Esta internalización puede ser dependiente o independiente de la proteína adaptadora AP-2 (**Fig.4**). AP-2 actúa como un heterotetrámero compuesto por dos subunidades grandes [alfa (α) y beta (β)], una subunidad mediana μ 2 y una pequeña σ 2 [13].

Introducción

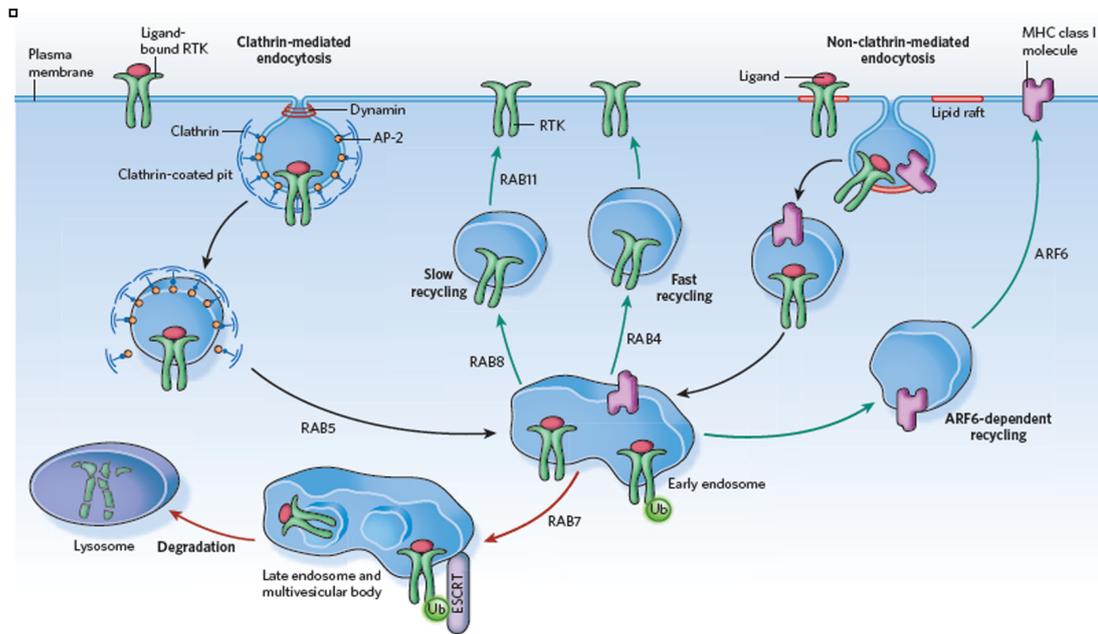


Fig.4 Ejemplos de diferentes mecanismos de endocitosis. La parte izquierda del diagrama representa la endocitosis dependiente de Clatrina. En la parte derecha se muestra el mecanismo independiente a Clatrina. Diagrama sacado de *The endocytic matrix*. Nature 2010 Scita G et al.

Santolini et al. demostraron en el año 2000 que Numb interactúa con la subunidad α -adaptina de AP-2, gracias a su dominio DPF en el extremo carboxi-terminal[14]. De este modo, Numb participa en la internalización de receptores, complejos moleculares, integrinas, etc., mediada por clatrina. Numb no sólo es capaz de participar en la endocitosis dependiente de clatrina, también se ha descrito una relación con proteínas EHD/Rme1, las cuales intervienen en rutas independientes de clatrina [15] (**Fig.4**). También posee un motivo NPF, el cual permite el reconocimiento de proteínas Eps15 (dominios EH), implicados en la endocitosis.

Numb también participa en el reciclaje y degradación de los receptores internalizados. Su participación en esta última tarea es resultado directo de su interacción con las ubiquitinas. Numb interacciona con la ubiquitina ligasa de tipo E3 Itch, y dentro de los timocitos interactúa con la ubiquitina Cbl [16, 17]. En

resumen, Numb parece jugar un papel activo y/o central en procesos de internalización dependientes e independiente de clatrina, tanto de manera dependiente como independiente de AP-2.

1.2.3.2 Adhesión Celular mediada por Numb

Otra de las funciones asociadas a Numb es el mecanismo de adhesión celular, tanto en las interacciones células-componentes de la matriz extracelular (ECM) como en las del tipo célula-célula. Una de las vías por las cuales Numb modula la adhesión celular es a través de su interacción directa con las cadherinas E (matriz extracelular) [18]. Esta unión es adquirida mediante el reconocimiento de la secuencia DNVYY [19]. Además de esta interacción, *Ze Zhou et al.* demostró que las cadherinas E, las cateninas β y el complejo PAR (aPKC-Par3-Par6) adquieren una localización sub-celular correcta gracias a la presencia de Numb.

En el trabajo de *Rasin et al.* se demostró que Numb y Numbl tienen una relación directa con las cadherinas y cateninas del sistema nervioso [20]. Las cateninas pertenecen a la familia Moléculas de Adhesión Celular (CAM) y tienen importancia en el mantenimiento de las uniones adherentes (*adherens junctions*) entre las células. La conclusión de este trabajo fue que la presencia de Numb es necesaria para el mantenimiento de las adhesiones mediadas por cadherinas en la neurogénesis.

1.2.3.3 Papel de Numb en la Migración Celular

Numb ha sido vinculada al mecanismo de migración celular, gracias en parte al trabajo realizado por *Calderwood et al (2003)* [21]. Ellos fueron pioneros en estudiar las interacciones de los dominios PTB con una de las cadenas que forman

Introducción

las integrinas. Las integrinas expresan uno o dos motivos NPxY en su cola citoplasmática β [21].

Los autores utilizaron secuencias cortas de diferentes cadenas β (distintas integrinas), demostrando la interacción directa entre Numb e Integrinas. El grupo de Calderwood pudo trazar un esquema exponiendo la interacción que tiene cada dominio PTB con las siguientes colas citoplasmáticas de integrinas: $\beta 1A$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$ y $\beta 7$. En este trabajo se identificó una interacción estable por parte del PTB de Numb con las colas citoplasmáticas $\beta 3$ y $\beta 5$. Sin embargo, para las colas $\beta 1A$, $\beta 2$, $\beta 7$ se reportó una interacción muy débil. A pesar de la débil relación encontrada por Calderwood para Numb- $\beta 1$, el trabajo de *Bogdanovic et al (2010)* describe una participación vital de Numb en la internalización de esta cadena [22], dando a entender que pese la “débil” interacción descrita, es suficiente para modular la cadena $\beta 1$.

La diferencia de reconocimiento que muestran los PTBs entre una cola citoplasmática y otra en las integrinas, se basa en la presencia de residuos polares y no polares alrededor de la secuencia NPxY. Los residuos no polares son los más adecuados para la unión del PTB a las colas citoplasmáticas β de las integrinas [21]. Con este trabajo, *Calderwood et al.* estableció tres principios generales para la interacción de los dominios PTB con las cadenas β de integrinas: (i) Las integrinas usan su motivo NPxY/F para unirse a PTBs (ii) Los aminoácidos en las posiciones -5 y +2 [en relación a la posición de Y o F] aumentan/disminuyen la preferencia de unión por los PTB y (iii) Una fosforilación de la integrina (usualmente en el residuo de tirosina) puede cambiar las especificidades de unión a los PTBs. Como se discutió anteriormente, esta fosforilación puede aumentar o inhibir el reconocimiento por parte del PTB.

Otro ejemplo de cómo Numb puede modular las integrinas se describe en el trabajo realizado por *Nishimura et al* [12]. En este trabajo se señala la interacción

entre Numb y el Complejo PAR, el cual está implicado en la internalización de integrinas. La interacción de Numb con este complejo esta mediada por la unión a uno de sus componentes, la proteína Par-3. Hasta el momento, se desconoce la existencia del complejo-PAR en los timocitos y/o linfocitos. En resumen, varios trabajos sugieren una posible participación a distintos niveles de Numb en la modulación de integrinas.

Otro factor que apoya la participación de Numb durante la migración celular, es su capacidad de polarización a la zona conocida como “*leading edge*” de la célula. Esta zona es una protuberancia en la membrana que crean las células para orientar sus movimientos. Dentro del “*leading edge*” se forman unos complejos de migración/anclaje llamados “*Focal adhesions*” (FA). Se ha descrito una distribución de Numb alrededor de estos complejos, sin embargo no hay evidencia de interacción directa con ninguno de sus componentes, con lo cual no se sabe si existe una participación de Numb en la formación de los mismos.

1.2.3.4 Numb en el desarrollo del Sistema Inmunitario

Las funciones de Numb y Numbl en diferentes órganos y sistemas han sido estudiadas ampliamente desde que se identificó su presencia en mamíferos [5]. Posteriormente se describió la expresión de Numb en el timo, manifestando una posible relación con el sistema inmunitario [5, 23]. Sin embargo, identificar las funciones de Numb en el sistema inmunitario no ha sido fácil, debido principalmente a que la técnica de delección (*knock out-[KO]*) para Numb no permite que el desarrollo de los ratones sea viable. Por tal razón se ha tenido que recurrir a delecciones condicionales, las cuales generaron resultados controvertidos.

Los resultados obtenidos utilizando ratones con una delección condicional no reflejaban alteraciones o daños durante el desarrollo de su sistema inmunitario al compararlos con ratones silvestre (WT) [24]. Este fenotipo “normal” podría ser el resultado de dos causas: (i) una compensación llevada a cabo por su homólogo Numbl (mencionado en la primera sección) o (ii) por un fallo en la técnica

Introducción

resultando en una delección incompleta de Numb (*leakiness*). Para superar los problemas de la posible compensación por Numbl el laboratorio de Anne Wilson creó ratones expresando delecciones en Numb y Numbl (delección doble) [25]. A diferencia de una delección simple, estos ratones presentaban un leve secuestro celular en la sub-fase de dobles negativos 3 (DN3) en el desarrollo de timocitos. Por otro lado, el laboratorio de C.J. MacGlade realizó estudios de sobreexpresión de Numb, utilizando la isoforma p66. Ellos tampoco lograron identificar una alteración importante en el desarrollo de los timocitos con la sobreexpresión de esta isoforma [26].

Hasta el momento, los enfoques moleculares utilizados para estudiar la funcionalidad de Numb en el timo no han sido totalmente efectivos. En este trabajo y anteriormente en nuestro laboratorio hemos utilizado ratones que expresan un dominante negativo para Numb. Este sistema de inhibición, que se había probado anteriormente, es más potente en la inhibición que la delección condicional [23]. Con esta técnica se consiguen cuatro ventajas frente a los modelos utilizados anteriormente.

En primer lugar se expresa una proteína que bloquea la ruta de señalización deseada, en segundo se expresa específicamente en un tipo celular, en tercero se puede controlar el momento y los niveles de expresión del dominante negativo en la célula, además, se expresa desde la primera progenie [27]. Nuestro laboratorio ha sido pionero en demostrar: *(i)* la implicación de Numb en el desarrollo de timocitos y *(ii)* el mecanismo de la división asimétrica durante el desarrollo en el timo [28]. Esta división asimétrica es dependiente de la segregación diferencial del pre-receptor de células T (pre-TCR) y Numb en los precursores de los timocitos. Con nuestro modelo de estudio hemos podido demostrar que, dependiendo del nivel de expresión de Numb, se determina el tamaño del timo (número final de células) y los niveles de señalización por el pre-TCR.

Otra de las funciones de Numb dentro del sistema inmunitario descritas en nuestro laboratorio es la modulación del TCR [29]. Nuestro laboratorio ha demostrado cómo la inhibición de Numb afecta la degradación del TCR, induciendo un aumento en su señalización. Una mayor señalización del TCR provoca un aumento en la producción de células CD4 SP, sin tener efecto alguno sobre la producción de las CD8 SP. Este efecto coincide con lo establecido en el modelo de señalización cinética (*Kinetic Signalling Model*). Este modelo se basa, en que la toma de linaje se produce según la señalización del TCR en una fase denominada CD4^{high}CD8^{medium}. Si las células reciben la señal del TCR, se convierten en CD4SP silenciando la expresión del co-receptor CD8 [29-31]. Por otro lado, si la señal de TCR cesa en la fase CD4^{high}CD8^{medium} re-expresan el co-receptor CD8 silenciando la expresión de CD4, convirtiéndose en células CD4^{medium}CD8^{high}. En resumen, el modelo cinético se basa en la duración para la señalización del TCR y no en la intensidad, como hace uno de los modelos clásicos; el Instructivo.

1.3 Migración Celular en el Sistema Inmunitario

1.3.1 Migración de los Linfocitos

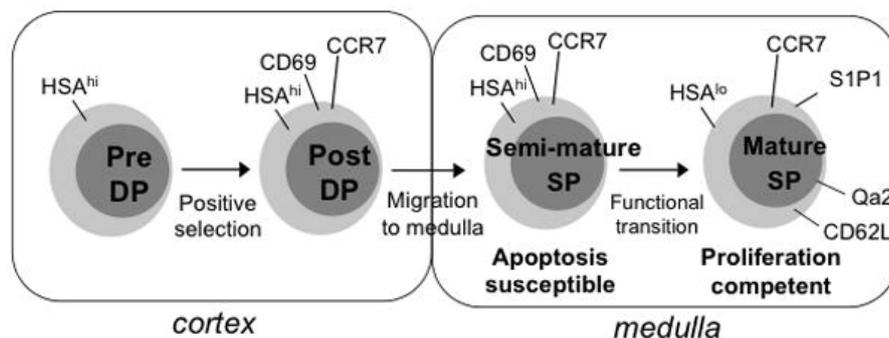
El timo es el órgano encargado del desarrollo y maduración de las células del linaje T. Este órgano se puede dividir anatómicamente en dos regiones: la corteza y la médula. Cada región posee funciones específicas que aseguran el desarrollo óptimo de estas células. Aproximadamente un 85% de los timocitos son Doble Positivos y se encuentran en la corteza, expresando bajos niveles de CD3/TCR [32]. Desde la década de los 90 se establecieron dos modelos para describir la migración de los timocitos.

Introducción

El primer modelo, conocido como “*Stochastic*” plantea la hipótesis de que los timocitos pueden salir en cualquier momento, hayan terminado o no su maduración[32]. El segundo modelo se conoce como “*Conveyor Belt*” el cual supone que todas las células deben terminar su maduración antes de salir del timo [32].

Actualmente, el modelo más aceptado es el “*Conveyor Belt*”, gracias en parte a experimentos donde se realizaban transferencias de células con fenotipo semi-maduro a los órganos periféricos. Estas células presentan una viabilidad muy inferior al compararlas con las células maduras. Estudios posteriores plantearon que la migración de células vírgenes por el mecanismo “*Conveyor Belt*” ocurre en 4 días [33]. Alrededor de un millón de células simple positivas (SP) pueden salir del timo al día [34].

Antes de migrar, los timocitos deben superar distintos filtros de maduración en la zona de la médula, donde la población SP espera aproximadamente 14 días para salir (Fig.4) [32]. En esta zona ocurren los últimos pasos de su maduración. Los timocitos maduros se identifican por la siguiente expresión superficial de receptores: $Qa-2^{\text{high}}$, $CD62^{\text{high}}$, $CD69^{\text{low}}$, HSA^{low} y $S1P_1^+$ [35]. Cualquier incapacidad para superar los filtros, o alteración en los niveles de receptores puede evitar una migración correcta [35].



□ **Fig.4 Fenotipo de los timocitos durante su desarrollo y maduración en las zonas del timo.** Diagrama sacado de *Thymic Emigration: when and how T cells leave home.* *J Immunol.* 2008 Weinreich MA

De todos los timocitos producidos, cerca del 5% logra superar los diferentes filtros de maduración, siendo estas las células capacitadas para la regulación homeostática de las células T: migrar, poblar y formar el repertorio de células T en la periferia [36]. A estas células que acaban de emigrar se las conoce con el término “*Recent Thymic Emigrants*” (RTE) [37].

Cuando los timocitos maduros están listos para salir del timo, utilizan las vías sanguíneas y/o linfáticas en la unión corticomedular como rutas de salida [35, 38]. Hasta el momento se sabe que el timo puede producir 6 poblaciones diferentes: células T $\gamma\delta$, células T $\alpha\beta$, células Natural Killer, células T reguladoras y progenitores de las células T intraepiteliales (IEL) [35]. La salida de los RTE en ratones alcanza su pico máximo aproximadamente a las dos-tres semanas de edad, disminuyendo considerablemente su migración alrededor de los tres-cuatro meses. Esta disminución en la salida de timocitos es paralela al proceso de involución del timo.

La migración de estas células depende de distintos eventos secuenciales, entre los que se incluye la adhesión y de-adhesión [36]. Estos últimos eventos se producen por interacciones entre los timocitos y las células TEC, que pertenecen a la ECM. Los complejos de adhesión formados por integrinas y selectinas, entre otros, permiten estas interacciones. De igual modo, las señales quimiotácticas ayudan a la distribución de los linfocitos en tejidos y órganos linfoides [39, 40]. Generalmente, la migración de los RTE es directa a los órganos linfoides secundarios (nódulos, bazo, sangre), pero existe evidencia de que en ocasiones puede existir una migración directa desde el timo a órganos terciarios, como por ejemplo al intestino [41].

Gracias a los avances en las técnicas de investigación y el desarrollo de diferentes inmunosupresores, se ha podido delimitar mejor el complejo proceso de migración en ratones adultos. Sin embargo, aún no se tiene una idea clara de cómo se lleva a cabo todo este proceso. Existen diferentes receptores, moléculas,

Introducción

complejos etc. que juegan un papel importante controlando y permitiendo la salida desde el timo. A continuación se abordarán los receptores y moléculas más relevantes a esta investigación.

1.3.2 Marcadores y Receptores relacionados con la migración de células T del timo a la periferia

1.3.2.1 Receptor de Células T (TCR)

La señalización por el receptor TCR ha sido relacionada con el momento de salida de los timocitos [42, 43]. El mecanismo más aceptado hasta ahora es el siguiente: las células semi-maduras reciben señales a través del TCR, manteniendo activo el receptor CD69. Estas señales del TCR hacen que la quinasa AKT (también conocida como PKB) fosforile al factor de transcripción “*Forkhead box O1*” (FOXO1). La fosforilación de FOXO1 provoca su translocación del núcleo al citoplasma, resultando en la inhibición del factor de transcripción “*Krüppel-like factor 2*” (KLF2). La no activación de KLF2 provoca una inhibición del receptor S1P₁, afectando la migración de los timocitos por no expresar adecuadamente este receptor.

Por otro lado, los timocitos maduros no reciben señales del TCR, cesando así la actividad del receptor CD69. FOXO1 permanece en el núcleo activando a KLF2, lo que lleva a una transcripción y expresión superficial de S1P₁. Una vez los timocitos expresan S1P₁ en su membrana, son atraídos por la presencia de S1P en la sangre. La activación de KLF2, además de modular la transcripción de S1P₁, modula la transcripción de *Sell*, el cual codifica para el receptor CD62L (selectina-L), que se mencionará más adelante.

1.3.2.2 Receptor de Activación Temprana CD69

El receptor CD69 es una glucoproteína transmembranal de tipo II que pertenece a la familia conocida como “*NK cell gene complex*” y a los receptores de señalización del tipo C (*C-type lectin-like*). Su expresión se concentra principalmente durante el desarrollo de los timocitos y en las primeras fases de activación de los linfocitos, tras el reconocimiento de un antígeno. Durante el desarrollo, CD69 se expresa en los timocitos DP, disminuyendo su expresión en los timocitos SP a medida que estos maduran.

La función de CD69 se relaciona directamente con las capacidades migratorias de los timocitos hacia la periferia, función similar a los receptores de quimioquinas, ya que ambos señalizan a través de proteínas G_i (asociadas a la migración). Experimentos en ratones con una expresión constitutiva de CD69 demostraron lo siguiente: la sobreexpresión de CD69 (*i*) no altera el desarrollo celular (*ii*) induce una acumulación específica de timocitos totales maduros en el timo (zona medular) y (*iii*) provoca una disminución en la periferia de células $\alpha\beta$ [44]. La conclusión de estos trabajos parece indicar que los timocitos tienen que disminuir la expresión superficial de este receptor para realizar una salida correcta del timo.

CD69 actúa por debajo del receptor de interferón-1 $\alpha\beta$ (IFNAR-1) en una cascada de señalización que puede modular otros receptores, como es el caso del receptor de Esfingolípidos-1 (*Sphingosine-1-phosphate-1/S1P₁*) [45] para modular la salida de los timocitos [46]. CD69 actúa como antagonista de S1P₁, induciendo su internalización [38], degradación y/o bajada de expresión (*downregulation*). Los ratones CD69^{-/-} muestran un aumento del 200% (2-fold) en la expresión de S1P₁.

1.3.2.3 Receptor de Esfingolípidos 1 (S1P₁)

S1P₁, también conocido como *Endothelial Differentiation Gene 1* (EdgI), es un receptor acoplado a proteínas G que se expresa en diferentes tipos celulares. Existen cinco isoformas de este receptor (S1P₁₋₅), de las cuales se han identificado en las células T solamente la 1 y la 4 [33, 35].

Los esfingolípidos son importantes moléculas de señalización con diferentes funciones, como proliferación, supervivencia, morfogénesis, expresión de moléculas de adhesión, regulación del tráfico de linfocitos y migración [47, 48]. Su función en los timocitos se descubrió gracias al inmunosupresor “*Fingolimod*” (FTY720), el cual administrado en ratones provoca un bloqueo de la salida de estos del timo [47]. El ligando para este receptor es S1P, secretado por los eritrocitos [48], que se encuentra en la sangre a unas concentraciones de 0.1-1 μ M [47] y en el plasma de 100-400nM [49]. La expresión de este receptor es aumentada durante la maduración de los timocitos [38] y disminuida en la periferia hasta que son activados, cuando lo vuelven a expresar para salir de los órganos periféricos. Otros tipos celulares como las células TCR $\gamma\delta$ y Natural Killer también dependen de su expresión para salir.

1.3.2.4 Receptor de Selectina-L (CD62L)

Las selectinas pertenecen a una familia de glicoproteínas transmembranales del tipo C (*C-type lectins*) que se presentan en 3 isoformas, selectina-P, E y L [50]. A la selectina-L no se le ha adjudicado un papel específico en la salida de los timocitos del timo, sin embargo tiene gran importancia como marcador de maduración y en la entrada a los nódulos linfáticos (LN) [35]. A pesar de esto, durante la maduración es necesaria una expresión alta de este marcador para tener un fenotipo de timocito maduro. Gracias a su dominio citoplasmático de 17

residuos, se considera una molécula de adhesión. CD62L se describió originalmente como el receptor que facilita el tráfico de los linfocitos a los nódulos linfáticos, permitiendo la adhesión de los leucocitos a los capilares en el flujo sanguíneo.

Además de CD62L, se ha encontrado que la selectina-P (PSGL-1) también participa en la entrada a los nódulos. PSGL-1 se expresa en células en reposo y facilita la entrada por medio de la interacción de CCL21-CCL19, en lo que parece ser una forma independiente de CD62L [40]. Los ratones PSGL-1^{-/-} tienen un menor número de células CD4 y CD8 en la sangre, esto se debe a que tienen una tasa 50% menor de salida, en comparación con los ratones salvajes.

1.3.2.5 El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

TGF- β es una citoquina que actúa como un regulador de crecimiento multifuncional. Se produce de forma activa en el timo por las TEC y se expresa en la zona subcapsular y cortical del epitelio, regulando el crecimiento de los timocitos [51]. Además, modula varias funciones en linfocitos, como la diferenciación, crecimiento, proliferación, tolerancia, homeostasis, respuesta inmune, etc. [51, 52]. En los tejidos de la periferia controla la activación y diferenciación. Los mamíferos expresan tres isoformas de la familia de TGF- β (TGF- β 1, 2, 3), siendo TGF- β 1 la predominante en las células T [52].

La importancia de TGF- β 1 dentro del sistema inmunitario se demostró utilizando ratones *knock-out* (KO). Con estos ensayos se pudo demostrar, por ejemplo, que las células T activadas tienen la capacidad para producir TGF- β 1 [53]. Esta habilidad permite a las células T controlar la expansión de Treg y la proliferación en el timo. TGF- β promueve la diferenciación o toma de linaje hacia células Natural Killer (NK), natural regulatory cells (nTregs), y regula positivamente la maduración y diferenciación de la población CD8 [52, 53]. Otra de las funciones con la que se ha relacionado TGF- β 1 es poder modular la expresión de moléculas de adhesión (integrinas) y la migración.

1.3.2.6 Quimioquinas

Además de la participación de las células epiteliales del timo (TEC) y la matriz extracelular (ECM) durante el desarrollo de los timocitos, existe evidencia de una participación por parte de las quimioquinas (chemokine) en el desarrollo. La expresión de quimioquinas se detecta en el timo desde la fase embrionaria hasta la fase adulta. Entre las quimioquinas que se expresan en el timo se encuentran: CC17, CCL19, CCL21, CCL22, CCL25 [54]. Algunos trabajos plantean que las quimioquinas pueden alterar la migración, aumentando la adhesión de las células T por la ECM [36]. Por ejemplo, la expresión de la quimioquina CCL25 (conocida como TECK) parece tener un efecto de retención de células en el timo y en el intestino. En este último, gracias a su capacidad se produce un cambio de expresión superficial en las integrinas de los linfocitos, cambiando de $\alpha 4\beta 7$ (LPAM-1) a $\alpha E\beta 7$ (CD103) [55].

Su receptor CCR9, es expresado en todas las fases de desarrollo en el timo, en las células TEC y las células dendríticas (DC). Una peculiaridad de CCR9 es que se expresa exclusivamente en la población CD8 SP en el timo (inmaduros y maduros), aunque a un nivel más bajo en los linfocitos de la periferia [37, 54]. Su funcionalidad se ha visto relacionada con la entrada de las células CD8⁺ a la lámina propia (epitelio intestinal), posiblemente por la capacidad de inducir la expresión y funcionalidad de CD103 en células intraepiteliales. Las CD8 vírgenes y linfocitos intraepiteliales co-expresan el receptor CCR9 y la integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103) [55]. Se ha comprobado que en los timocitos maduros ocurre una bajada de expresión de CCR9 antes de su migración [36].

De la misma forma, la combinación de CCL19 y su receptor CCR7 juegan un papel en la salida de los timocitos del timo. Los ratones con fenotipos CCL19^{-/-} o CCR7^{-/-} tienen un desarrollo normal, pero presentan un aumento (acumulación) de timocitos en el timo y una disminución en el número de células circulando por la

periferia [36]. Los ratones $CCR7^{-/-}$ presentan una acumulación de timocitos simples positivos en la corteza, sin embargo estas células logran hacer una migración desde esa zona, dando a entender que la corteza tiene la maquinaria para ejercer esta función, al igual que la médula [56]. Se piensa que CCL19 es necesario para posicionar a las células simples positivas adyacentes a las células endoteliales, para que así puedan responder a la presencia de S1P en la sangre (proceso mediado por $S1P_1$) [56].

Se ha observado que timocitos $CD69^+$ despliegan una migración mayor a CCL19 y CCL25, los ligandos de los receptores CCR7 y CCR9 respectivamente [42]. Estos ligandos se encuentran en la zona de la médula del timo. Un aumento en la interacción de estos timocitos podría aumentar su tiempo de estancia en esta zona, suceso que podría afectar finalmente la salida de las células.

Sin embargo, se ha visto que, en ratones adultos, la migración de timocitos es independiente del receptor CCR7, encontrándose un efecto mayor en la fase de neonatos, la migración cortico-medular y entrada de los nódulos [35, 57]. A pesar de esto, existe un gran debate sobre la participación real o no en el proceso de migración por parte del CCR7 [58].

1.4 Moléculas de Adhesión: Integrinas

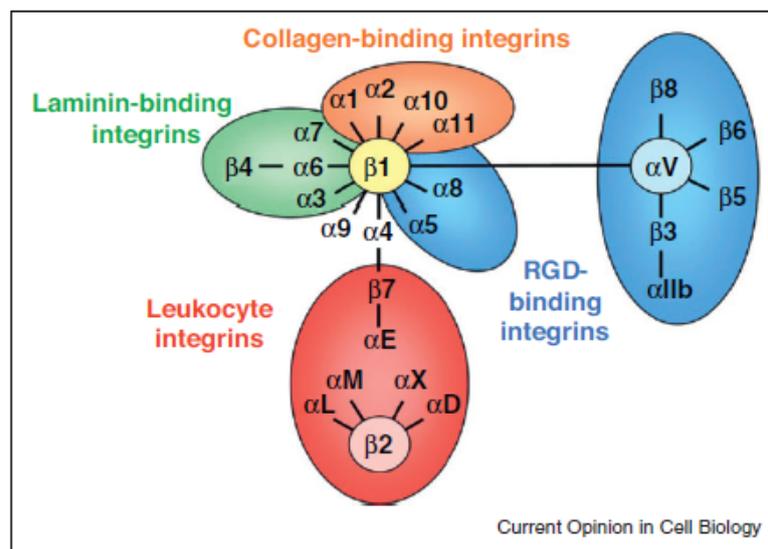
1.4.1 Descripción y Estructura Molecular

Las integrinas constituyen una superfamilia de receptores conservados evolutivamente, siendo su función principal la adhesión celular. Su funcionalidad se basa en la capacidad de interactuar con diferentes moléculas, como proteínas y/o complejos de la matriz extracelular (ECM), estando estos ligandos presentes en la

Introducción

membrana celular o en menor medida en estado soluble. Su estructura consiste en un heterodímero transmembranal compuesto por cadenas alfa y beta (α/β).

Hasta el momento se han identificado en los mamíferos 18 subunidades alfa (α) y 8 subunidades beta (β), permitiendo la combinación final de 24 integrinas diferentes [59] (**Fig.5**). Las cadenas α/β no exhiben homología alguna entre ellas. Sin embargo, existe evidencia de un porcentaje de homología dentro de las isoformas que forman cada familia, con un 30% en las cadenas α y hasta un 45% en las cadenas β [59].



▣ **Fig.5 Clasificación de las Integrinas.** Grafica representativa de las diferentes isoformas de cada cadena y su organización para formar las 24 Integrinas diferentes. Diagrama sacado de “*Mechanisms of integrin activation and trafficking*”. Margadant C. et. al 2011

Cada cadena juega un papel dentro del funcionamiento de las integrinas. A las cadenas α se les adjudica un papel de regulación, mientras que a la cadena β un papel en la activación de las mismas [60]. Mediante la técnica de la cristalización se demostró que los extremos extracelulares de las integrinas son los más largos y cada subunidad (α - β) posee sus propios dominios de enlaces, contribuyendo así a sus funciones.

Entre los dominios extracelulares se encuentra el dominio de reconocimiento RGD, uno de los dominios más importantes y necesarios para que puedan ejercer su función en la adhesión celular. Este dominio reconoce el tripéptido formado por Arg-Gly-Asp, que se encuentra en las glucoproteínas de la matriz extracelular (ECM) [61], modulando la interacción con estas proteínas. Por otro lado, el extremo intracelular, o dominio citoplasmático, presenta una longitud menor, con solo 75 aminoácidos de largo (existen algunas excepciones). El extremo citoplasmático de la cadena β posee una interacción mayor con los componentes ECM, en comparación con el extremo citoplasmático α .

Además, el extremo citoplasmático de las cadenas β exhibe 1-2 motivos NPxY, que les permite ser reconocidas por proteínas de señalizaciones celulares o adaptadoras. Un ejemplo de estas interacciones es el reconocimiento de la cadena β por la proteína Talin, permitiendo su interacción con los filamentos de actina, paso significativo en la migración celular[62]. En las células T se expresan las integrinas con las siguientes isoformas de cadena beta: β_1 , β_2 y β_7 [63].

1.4.2 Mecanismos de Regulación de las Integrinas: activación, expresión y afinidad

1.4.2.1 Activación

Para que las integrinas puedan realizar correctamente sus funciones, sus niveles de activación deben ser controlados. Las integrinas permanecen mayormente en una conformación inactiva, permitiendo un movimiento libre de las células. En esta conformación, sus extremos extracelulares se mantienen plegados (evitando la unión a sus ligandos) y los extremos intracelulares están entrelazados entre ellos y unidos simultáneamente al citoesqueleto (**Fig.6**). Una interrupción de este anclaje intracelular al citoesqueleto activa la integrina, lo que le permitirá agruparse con

Introducción

otras en la membrana celular y extender los extremos extracelulares para unirse a su ligando. Una vez finalizado el reconocimiento del ligando se restablece la interacción de las colas citoplasmáticas con el citoesqueleto, dando estabilidad a la adhesión celular [59, 62]. Actualmente no existe evidencia demostrando que todas las integrinas funcionen según el mismo patrón de activación. Sin embargo, se piensa que deberían seguir un mecanismo similar.

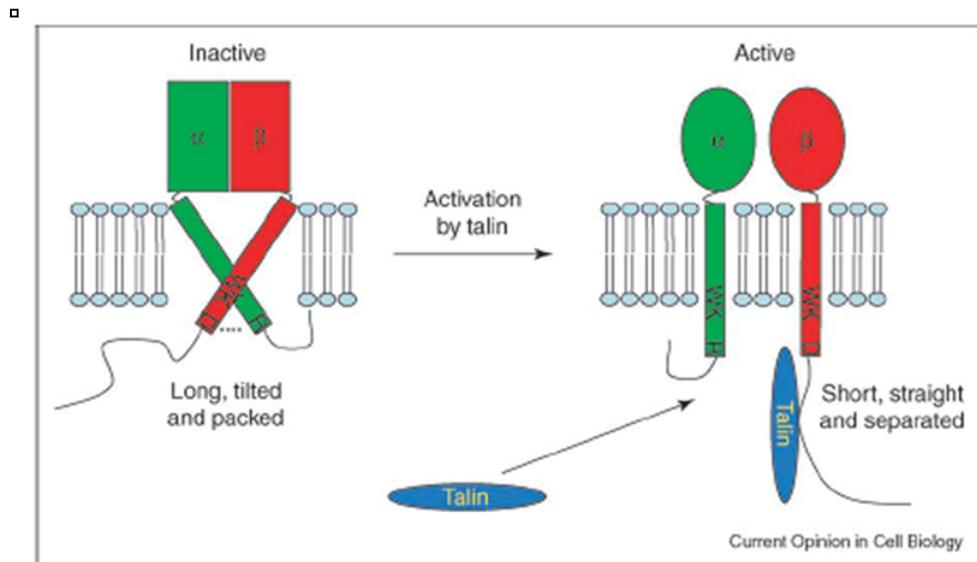
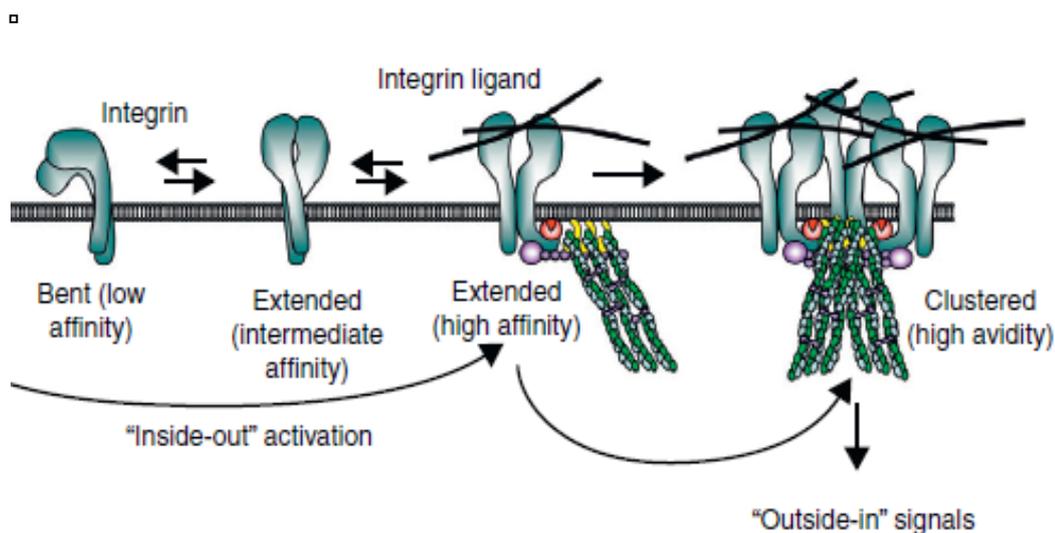


Fig.6 **Representación de la activación de Integrinas** Esquema de las conformaciones adquirida por las integrinas inactivas (izquierda) y activas (derecha). Diagrama sacado de *Integrin regulation. Curr Opin Cell Biol. (2005) Ginsberg MH et. al*

La activación está controlada por dos mecanismos principales (i) el flujo de señales intracelulares (mejor conocido como el mecanismo *inside-out signalling*) para comenzar los pasos de activación, y (ii) señales extracelulares (*outside-in signalling*) que transmiten hacia el interior de la célula las señales que resultan del reconocimiento al ligando por las integrinas (**Fig.7**). El mecanismo “*inside-out signalling*” está modulado a su vez por la fosforilación en la cadenas β , que es llevada a cabo por los receptores asociados a proteínas G (GPCR) [59]. Anteriormente señalamos que las GPCR también fosforilan a Numb, modulando así su localización intracelular.

Otros factores que poseen capacidad para modular la activación de las integrinas son las concentraciones de ciertos iones como: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} . La activación utilizando un anticuerpo monoclonal también es factible [64]. También existe evidencia de cómo la participación de quimioquinas (chemokines) y las GTPasas Rho/Ras pueden activar las integrinas [59, 62].



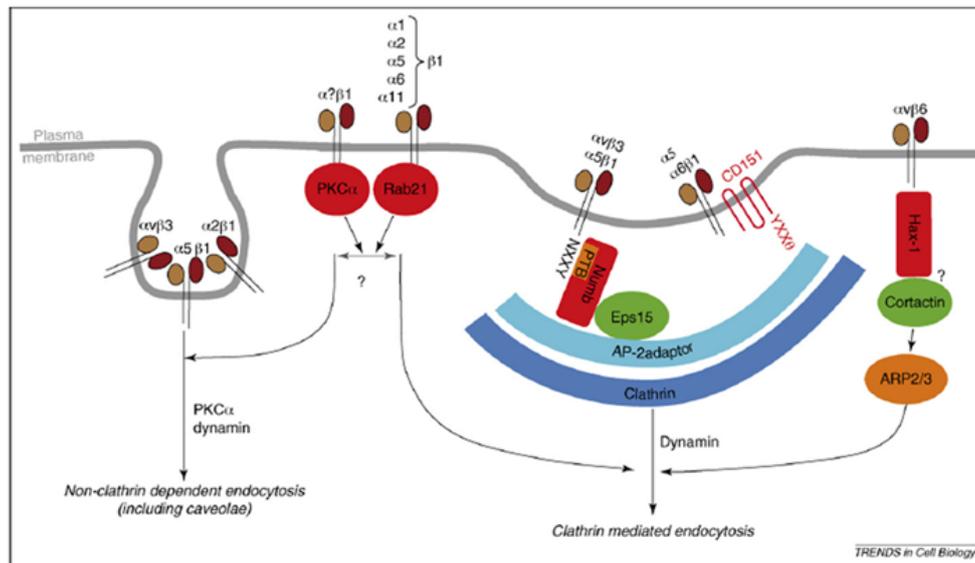
□ **Fig.7 Representación del reconocimiento por Integrinas** Secuencias de los pasos en la activación y la respectiva afinidad por su ligando. Diagrama sacado de *Mechanisms of integrin activation and trafficking*. *Curr Opin Cell Biol.* (2011) Margadant C. et. al

1.4.2.2 Regulación de la Expresión y Afinidad a ligandos

Hasta el momento, se han descrito tres procesos para controlar la expresión superficial de las integrinas. Estos mecanismos se conocen como: (i) la exportación a la membrana de nuevas integrinas sintetizadas (*bio-synthetic secretory pathway*), (ii) la internalización de la integrina y (iii) el mecanismo de reciclaje o degradación [65]. En los últimos años (2011) se ha descrito cómo el mecanismo de internalización puede estar mediado por clatrina y sus adaptadores AP-2 y Dab-2,

Introducción

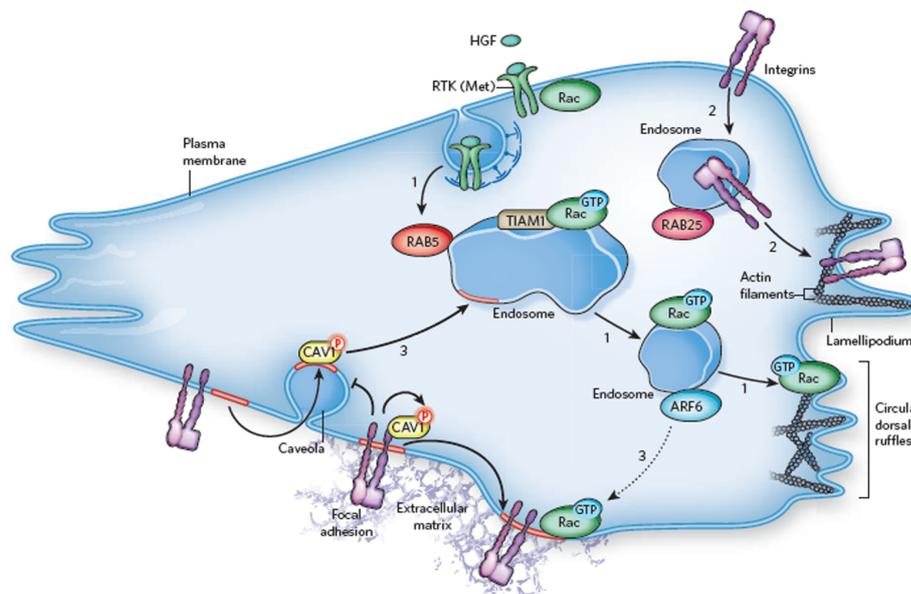
gracias a la interacción directa con las cadenas β mediante la secuencia NxxY (**Fig.8**) [66]. AP-2 es una proteína adaptadora al igual que Numb, con la diferencia de que Numb necesita la secuencia NPxY/F para reconocer las cadenas β . A pesar de esto, y como se mencionó anteriormente, Numb interactúa con AP-2 (ver Fig.4) y con ciertas cadenas β , existiendo la posibilidad de un complejo Numb-AP2-cadenas β .



▣ **Fig.8 Internalización de Integrinas** Gráfica representativa de los diferentes mecanismos que pueden utilizar las integrinas para su internalización. Diagrama sacado de *Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion. Trends. Cell Biol (2008) Patrick caswell et. al*

Algunas integrinas pueden ser internalizadas por más de un mecanismo en la misma célula, por ejemplo la integrina $\alpha 5 \beta 1$ [11]. Las integrinas pueden ser internalizadas por varias rutas: (i) endocitosis vía clatrina, (ii) endocitosis no dependiente de clatrina y (iii) endocitosis dependiente de caveolina [11]. Algunos estudios han demostrado que la alteración de cualquiera de las moléculas del mecanismo de internalización alteran su expresión, causando sobreexpresión, disminución o una pérdida completa de expresión superficial de las integrinas [65]. Estos sucesos, a su vez, modificarían el comportamiento de adhesión y migración celular.

Dentro de este contexto, Numb participa en el proceso de ubiquitinización, mecanismo responsable en decidir si las integrinas al ser internalizadas, son degradadas o recicladas [11] (**Fig.9**). Dentro de los endosomas se han identificado rutas que están involucradas en el destino de la integrinas. El endosoma Rab4 se encarga de llevar a las integrinas nuevamente a la membrana de una forma directa, mecanismo con el nombre de “*rapid recycling regulator*”. Por otro lado, el endosoma Rab11 y el regulador de tráfico para las vesículas “*ADP-ribosylation factor 6*” (Arf6) se encargan del reciclaje por una ruta alterna y más larga, llevando primero las integrinas al compartimiento de reciclaje perinuclear (*perinuclear recycling compartment-PNRC*) y posteriormente a la membrana. Se sabe que Numb tiene una participación dentro del mecanismo de Arf6 [11].



▣ **Fig.9 Tráfico intracelular de las Integrinas.** Visualización de las posibles rutas que pueden tomar las integrinas para su degradación o reciclaje una vez internalizadas. Diagrama sacado de *The endocytic Matrix Nature (2010) Scita G et. al*

Una vez que las integrinas son activadas, pueden unirse a sus ligandos según la afinidad que manifiesten. Esta afinidad depende del *momentum* de activación en el que se encuentren las integrinas, y de la conformación del extremo extracelular (**ver Fig.7**). Para que ocurra el cambio conformacional de los extremos

Introducción

extracelulares hay dos modelos establecidos: el modelo “cerradura” (*deadbolt model*) y el modelo “navaja” (*switchblade model*) [59]. Una vez se haya completado el mecanismo de activación por las señales intrínsecas (*inside-out signalling*), el extremo extracelular adquiere una conformación extendida, alcanzando una mayor afinidad por el ligando. Este reconocimiento por el ligando permite llevar la cascada de las señales extracelulares al interior de la célula para activar a otras integrinas o modular la activación, llevando a cabo el segundo mecanismo de activación “*outside-in signalling*”.

Otra forma que tienen las células T para regular la adhesión celular mediada por integrinas es vía receptores superficiales [67]. Los linfocitos tienen una característica peculiar, pueden pasar de células no-adherentes a células adherentes (una vez activadas) por estimulaciones de los receptores TCR, CD2/CD28 y quimioquinas. La fosforilación del TCR activa a las quinasas Src, LcK y Fyn. La quinasa Src fosforila a los ITAMS (*Immuno receptor tyrosine-based activation motif*) y a Zap70, provocando un ensamblaje de complejos multi-moleculares, los que van a señalar para la formación de mensajeros secundarios. Estos mensajeros secundarios serán finalmente los que modulen el aumento en la afinidad al ligando [67].

El receptor TCR utiliza el mecanismo intrínseco (*inside-out*) y la ayuda de los adaptadores “*Adhesion and degranulation promoting adapter protein*” y “*Src-like adaptor protein*” (ADAP/SLAP) para activar las quinasas. El adaptador ADAP se expresa tanto en timocitos como linfocitos T [43]. Los timocitos de ratones ADAP^{-/-} presentan una adhesión incompleta si esta es dependiente de la estimulación por TCR, ejemplo, la adhesión mediada por las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$. Este dato es importante, ya que son las cadenas que más predominan en los linfocitos T, formando integrinas básicas e integrinas importantes dentro del sistema inmunitario, como por ejemplo la integrina LFA-1 ($\alpha L\beta 2$). Esta última participa en el proceso de entrada (*homing*) a los nódulos linfáticos [68]. Un dato a recordar es que Numb

interacciona con estas dos cadenas beta. Otro regulador que puede modular las integrinas y es dependiente de la activación de TCR es la GTPasa Rap1. En este mecanismo también participan las moléculas ADAP y la quinasa Src. La GTPasa Rap1 tiene varias funciones importantes, destacando la redistribución de las integrinas de la parte posterior a la parte frontal (*leading edge*) de la célula, evento clave para guiar y completar la migración.

Estas distintas cascadas de señalización convierten en cierta forma al TCR en un modulador central de la adhesión y migración. Además, ADAP comparte localización con Numb en los complejos de migración “*focal adhesion*” (FA), explicado anteriormente (pag.15). La diferencia reside en que ADAP sí posee una interacción directa con Zyxin y Vinculin vía el dominio EVH1. Esta interacción de ADAP con los componentes de FA nos invita a pensar en una posible colaboración de Numb en la adhesión estimulada por TCR.

1.4.3 Funciones de las Integrinas en las células

Las integrinas han sido relacionadas con diversos procesos fisiológicos y de control celular, principalmente gracias a su relación con las glucoproteínas de la matriz extracelular (fibronectina, vitronectina, laminina, etc.). Esta interacción es mediada por la expresión de receptores para el reconocimiento de la secuencia RGD, como se mencionó anteriormente. Entre los campos en que se ha identificado la participación de integrinas se encuentran: la embriología, mecanismos de hemostasis, sistema inmunitario, adhesión celular [61, 62], crecimiento celular, diferenciación, migración [69] entre otras.

Las integrinas están estrechamente ligadas al sistema inmunitario por su participación en la adhesión y migración celular. Además, pueden llevar a cabo otras funciones como, por ejemplo, la cadena $\beta 2$. Entre las integrinas que expresan esta cadena se encuentran: LFA1= α L β 2, Mac1= α M β 2 y CD11d/CD18= α d β 2. De todas estas integrinas la que más sobresale es LFA-1, a raíz de su participación en

Introducción

múltiples procesos como la sinapsis inmunológica, la entrada a los nódulos linfáticos y la adhesión celular durante ciertos tipos de reconocimiento de antígenos.

La migración celular en el sistema inmunitario también depende en cierta medida de las integrinas. Para realizar su función correctamente, es necesario que las células T (y otras poblaciones) migren a los órganos linfoides secundarios. Según estudios realizados, las células del sistema inmunitario tienen una velocidad de 5-40 μ m/min en su migración [68], considerándose una migración rápida. Por tal razón, *Evans. R et al.* expone en su trabajo que estas células carecen de los complejos de adhesión “*Focal Adhesion*” en la protuberancia de la membrana (*leading edge pag.15*) mencionados anteriormente.

1.4.4 Las Integrinas $\alpha_E\beta_7$ (CD103) y $\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1) en timocitos y linfocitos

También se ha observado la participación de otras isoformas de la cadena β_7 (1,4,7) en funciones inmunológicas. Entre las integrinas formadas con la cadena β_7 y que están expresadas por las células T, se encuentra la integrina $\alpha_E\beta_7$, también conocida como: α_{IEL} , α_{m920} , OX62 o CD103 (de aquí en adelante nombrada como CD103). La cadena α_E interacciona exclusiva y únicamente con la cadena β_7 , asegurando una expresión de CD103. Esta integrina participa en los procesos de adhesión y migración celular, siendo regulada por el mecanismo de activación intrínseco (*Inside-out*) [70]. Su expresión es del 3-5% tanto en los timocitos fetales como en los adultos. Además, CD103 es una integrina prácticamente específica para las células CD8, aunque también se ha reportado su expresión en las células dendríticas [59].

Su distribución en las distintas subpoblaciones de timocitos es de la siguiente forma. En los timocitos DN, un 10-17% poseen altos niveles superficiales, expresión que se pierde por completo al entrar a la fase DP. Una vez llegan a la fase simple positivos, los timocitos CD4⁺SP presentan una ligera expresión del 2%,

mientras la población CD8⁺SP expresa un 30-50% de esta integrina en la superficie. Por otro lado, en ratones adultos los linfocitos CD8 alojados en los nódulos linfáticos son 40-70% positivos para CD103, mientras las células CD4 tienen nuevamente una mínima expresión del 5% o menos [71]. También se ha observado que las células T con el receptor gama-delta (TCR- $\gamma\delta$) tiene una expresión para CD103 [71, 72].

La población de células T con mayor expresión para CD103 son los linfocitos alojados en la mucosa intestinal, es decir, los linfocitos intraepiteliales (IEL) [70, 71, 73]. Se puede considerar que CD103 fue descrita originalmente como marcador de la población IEL [74]. Hasta un 90% de los linfocitos IEL alojados en la mucosa son células CD8, y llegan a expresar niveles superficiales de hasta un 90% de CD103 [72]. Estas células se piensa que proceden de una migración desde los órganos linfoides secundarios (nódulos linfáticos, sangre, bazo). Una migración inmunitaria directamente del timo hasta el intestino (órgano terciario) parece ser un comportamiento menos frecuente, aunque se han detectados casos [41].

CD103 ha sido relacionada con importantes procesos celulares como: presentación de antígeno, estimulación de células CD8⁺ en la mucosa (vía células dendríticas CD103⁺), estimulación de las células T reguladoras (T_{reg}) [74] y dirige/orienta la localización de las células CD8⁺ al intestino. También participa en la localización de las CD8 en la epidermis, donde hay un 55% de CD8 versus un 5% en la dermis [63]. Por último, también se ha visto implicada en la enfermedad de psoriasis (acumulación de CD103⁺ en epidermis), en guiar los linfocitos a zonas de inflamación, rechazo de trasplantes y con la actividad citotóxica de las CD8. Todo esto gracias a su capacidad para influir en la locomoción celular [74].

Gracias al trabajo realizado en la década de los 90 por *Karyn L Cepek et. al.*, se demostró bioquímicamente que CD103 reconoce la cadherina E (Ecad) como su ligando de adhesión [39]. Siendo la cadherina E, hasta el momento el único ligando

Introducción

descrito para CD103. La Ecad se encuentra en la matriz extracelular y es expresada tanto por células estromales como epiteliales, incluyendo en este último grupo las células epiteliales del timo (TEC) en la zona de la medula [75, 76]. Razón por la cual y mediante la inmuno-histoquímica, se ha identificado la zona medular del timo como la localización preferida para los timocitos αE^+ (CD103+) [70, 71]. Otros lugares donde también se han encontrado células T αE^+ son el tracto genitourinario y el pulmón.

Aparte de la integrina CD103, otra integrina con cadena β_7 que predomina en la membrana plasmática de los timocitos y linfocitos es $\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1)[77], cuyo ligando MAdCAM-1 se expresa en el intestino. Su mayor diferencia con CD103, es que LPAM-1 se puede expresar en ambas subpoblaciones (CD4/CD8), no teniendo esa especificidad que presenta CD103. Sin embargo, y al igual que CD103, participa en el proceso de migración de los linfocitos hacia la mucosa intestinal. Según los estudios realizados sobre la migración intestinal, se ha establecido que la migración al intestino de los timocitos CD8⁺ recién emigrados (un 2-10%) se basa principalmente en la integrina LPAM-1 ($\alpha_4\beta_7$) y, en el receptor de quimioquina CCR9 [41]. Una vez los linfocitos CD8 han entrado al intestino se produce un cambio de expresión superficial, disminuyendo los niveles de LPAM-1 y aumentando los de CD103, logrando una retención de las células en este espacio.

No obstante, se ha demostrado que la migración intestinal depende de la cadena β_7 y no por completo de las cadenas alfas. Ratones con un fenotipo de *knock-out* (KO) para la cadena $\alpha E^{-/-}$ o $\alpha 4^{-/-}$ logran una migración parcial de los linfocitos hacia el epitelio intestinal [39]. Gracias al trabajo realizado por *Leo Francois et.al*, donde comparó diferentes fenotipos de KO ($\alpha E^{-/-}$, $\alpha 4^{-/-}$ y $\beta_7^{-/-}$) observó que únicamente los ratones con el fenotipo $\beta_7^{-/-}$ mostraban una reducción significativa de linfocitos en el intestino con respecto a ratones salvajes WT. Por tanto, la función primordial de modular la migración hacia los compartimiento intestinales parece ser exclusiva cadena β_7 [78].

Las alteraciones de la cadena β_7 también se han relacionado con enfermedades clínicas, como por ejemplo los Mielomas Múltiples (MM). Se observó cómo una inhibición de β_7 disminuye hasta un 70% la interacción entre los mielomas y la matriz extracelular [79]. Otras enfermedades donde se ha descrito una alteración de la cadena β_7 son: la colitis, linfoma tímico, linfomas non-Hodgkin y en enfermedades inflamatorias como la dermatitis atópica o Lichen Planus por un aumento de CD103.

1.4.4.1 TGF- β_1 como modulador de la integrina CD103

Se ha observado que la expresión de CD103 puede aumentar hasta un 52.8% cuando se incuban *in vitro* con TGF- β_1 . De hecho, el modelo que se tiene aceptado es que, una vez los linfocitos IEL entran al intestino aumentan la cadena αE gracias al TGF- β_1 presente en este compartimiento [72]. La modulación de TGF- β_1 sobre CD103 se puede explicar gracias a la presencia en ambas cadenas (αE y β_7) de regiones conocida como “*TGF- β_1 responsive elements*” que facilitan esta interacción. El TGF- β_1 es producido y secretado por las células como un precursor inactivo, conocida como “*Latent form complex with latent-associated protein (LAP)*” o “*Latent TGFb binding protein*” (LTBP) [52]. Hasta el momento, se conocen solamente dos integrinas capaces de modular la degradación de LAP, lo que permite la activación de TGF- β , liberando el homodimero activo. Estas son las integrinas $\alpha\nu\beta_6$ y $\alpha\nu\beta_8$ [52], ambas expresadas por las células epiteliales.

La integrina $\alpha\nu\beta_6$ fue la primera en describirse como activadora del complejo TGF- β -LAP[80]. Esta activación se lleva a cabo mediante el contacto directo (*cell to cell contact*) al reconocer el motivo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), provocando un cambio conformacional en LAP que libera a TGF- β . Estudios realizados en ratones $\alpha\nu\beta_6^{-/-}$ demostraron que su ausencia no induce alteraciones severas comparada con la ausencia de $\alpha\nu\beta_8$. Además, para nuestra investigación $\alpha\nu\beta_6$ no es relevante, ya que no se expresa en las células del sistema

Introducción

inmunitario[81]. Por ende, no se ve afectado por el dominante negativo expresado en nuestras ratones transgénicos.

Por otro lado, la integrina $\alpha\nu\beta_8$ se expresa en las células T e interacciona directamente con LAP. A pesar de esa interacción, no posee la capacidad para degradar a LAP por sí sola, necesitando la participación de las metaloproteinasas MT1 [*“Membrane type 1-matrix metalloprotease (MT1-MMPs)”*] [52, 80, 82]. Se piensa que el complejo TGF- β -LAP es llevado a la membrana celular por $\alpha\nu\beta_8$ y activado por la MT1-MMP [80]. Hasta el momento, la cadena β_8 es la única cadena en poder activar las metaloproteinasas [82].

La interacción de MT1-MMPs junto a LAP es dependiente de la cadena β_8 . Ensayos utilizando células dendríticas KO para el gen de beta8, presentaron el mismo fenotipo de ratones KO para TGF- β_1 . En resumen, las células dendríticas inducen una estimulación del TCR al ejercer como células presentadoras de antígenos. Esta estimulación de TCR activa las células reguladoras Treg, las cuales secretan TGF β -LAP que será activado por $\alpha\nu\beta_8$ presenten en las células dendríticas.

Otro posible mecanismo para el efecto de TGF- β_1 sobre CD103 es el factor de transcripción *“Runt Domain factor”* (Runx3), que actúa *“downstream effector”* de TGF- β , induciendo la expresión de CD103 [83]. Curiosamente, Runx3 es necesario para el desarrollo de los timocitos CD8, ya que reprime la expresión del receptor CD4. Una combinación adecuada de TGF- β y Runx3 puede inducir la expresión de CD103 incluso en la población CD4 [83]. Estudios realizados en la línea celular TK-1, que expresa altos niveles de $\alpha_4\beta_7$, demostraron que tras de una incubación de 30 minutos con TGF- β , las células CD8 SP expresaban un aumento superficial de CD103. Por otro lado, la inhibición de Runx3 reduce la frecuencia de expresión de CD103 en la población CD8SP.

Al igual que TGF- β_1 , se ha encontrado que las interleuquinas IL-2 e IL-4 [76] pueden aumentar la expresión de CD103, aunque a un nivel menor. Por otro lado, la

interleuquina 12 (IL-12) tiene un contradictorio sobre CD103, disminuyendo su expresión. Otros autores señalan que luego de la activación celular, la señal de CD103 se pierde rápidamente [77].

Justificación y Objetivos

2 Justificación y Objetivos

La proteína adaptadora Numb ha sido descrita como pieza clave en múltiples sistemas durante los procesos de toma de decisión de linaje en las células en desarrollo. Además, y gracias en parte al trabajo realizado por nuestro laboratorio en los últimos años se ha podido empezar a vincular la función de Numb con el Sistema Inmunitario. Sin embargo, muy poco se sabe del papel e importancia que pueda tener a este nivel. Con el propósito de aclarar el grado de participación de Numb durante el desarrollo y función de las células T, establecimos los siguientes objetivos para esta tesis:

- Papel de Numb durante el desarrollo y maduración de timocitos en el timo.
- Estudio del papel de Numb en la modulación de receptores de migración y adhesión en timocitos.
- Implicación de Numb en la toma de decisiones durante el patrón de migración periférica de linfocitos T maduros.

Materiales y Métodos

3 Materiales y Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Ratones Utilizados para estudiar la funcionalidad de Numb en el Sistema Inmunitario.

A) Ratones Silvestres (WT)

Pertencen a la cepa C57BL/6 y no expresan ninguna alteración en la expresión de la isoforma p71 de Numb (Fig. 10-A)

B) Ratones con inhibición para Numb (TG-dnNb)

Estos ratones de la cepa C57BL/6 fueron modificados por la Dra. Matilde Cañelles en el laboratorio de la Dra. B. J. Fowkles en las instalaciones de NIH. Siendo cedidos por la misma a nuestro laboratorio para el estudio de Numb. Expresan una versión truncada (no extremo carboxi-terminal) de la isoforma p71 que está compuesta solamente por el dominio PTB de Numb (Fig.10-B). Para el reconocimiento y diferenciación de la proteína endógena la construcción TG-dnNb tiene una secuencia c-Myc tag humana que flanquea el dominio PTB. La expresión de la proteína transgénica está bajo el promotor CD2. El cual es específico para las células T y expresado por más del 95 por ciento de timocitos.

C) Ratones con una sobreexpresión para Numb (TG-NUMB)

Ratones C57BL/6 que presentan múltiples (copias de la isoforma p71, provocando una sobreexpresión de esta proteína en los ratones (Fig.10-C).

D) Ratones Dobles Transgénicos (2TGs)

Ratones producto del cruce entre las líneas transgénicas TG-dnNb y TG-NUMB.

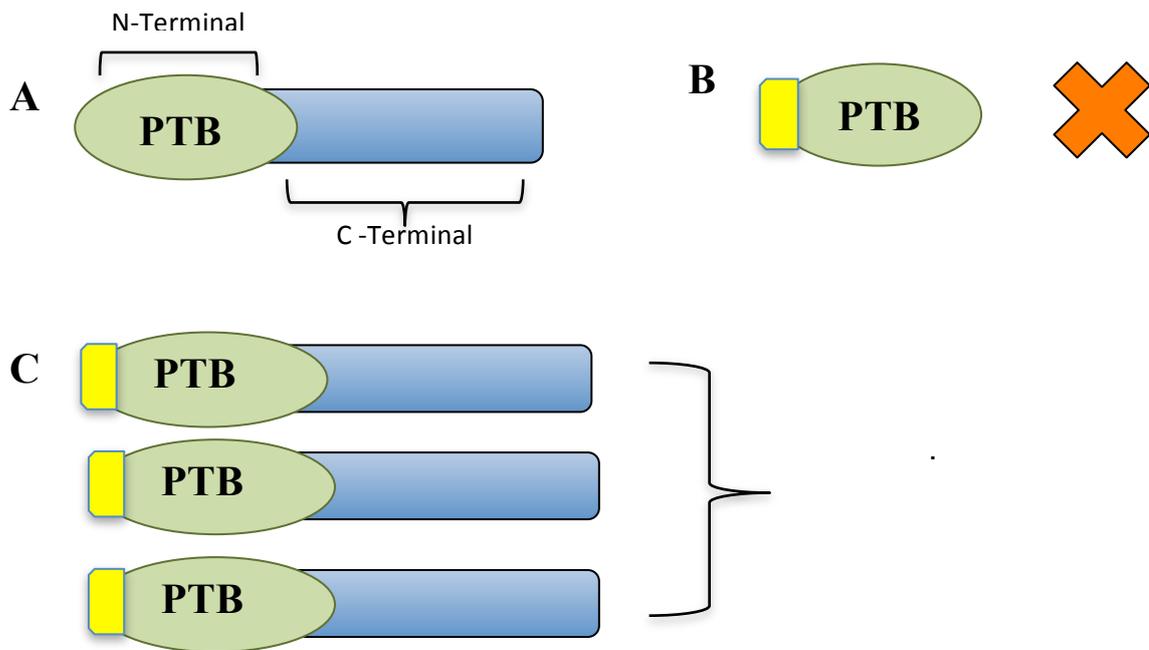


Fig.10 *Esquema estructural de Numb y del dominante negativo (dnNb).*

(A) Estructura normal para Numb endógena, p71 (B) Estructura del dominante negativo (dnNb) para p71. (C) Sobreexpresión de Numb (TG-Numb). La secuencia de identificación c-Myc representada por el cuadro amarillo.

3.1.2 Medios de Cultivo Utilizados

3.1.2.1 Medio 199 Completo

El Medio 199 (Gibco®) modificado con L-glutamina y sin HEPES fue utilizado para la extracción y manipulación de los timocitos y linfocitos. Fue suplementado con suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen) al 10% y los antibióticos penicilina y estreptomina al 1%. El FBS fue inactivado antes de su uso incubándolo a 56°C durante 30 minutos.

3.1.2.2 Medio RPMI 1640 Completo

El Medio RPMI 1640 (PAA Company) fue utilizado para el cultivo celular, incubaciones en CO₂ de timocitos y linfocitos. Fue suplementado con suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen) al 10% y los antibióticos penicilina y estreptomycin al 1%. El FBS fue inactivado antes de su uso incubándolo a 56°C durante 30 minutos.

3.1.2.3 Medio de Congelación

El medio de congelación utilizado se preparó mezclando 90% de FBS inactivado más 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). EL DMSO se usa en la congelación de las células ya que evita la formación de cristales en las mismas.

3.1.3 Tampones y soluciones generales utilizadas

- a) **Tampón fosfato salino (PBS):** NaCl 130 mM; KCl 2,6 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM. Ajustar a pH 7. En ocasiones también se utilizó pastillas de PBS (Amresco) para disolver en 1L de agua MilliQ Pura.
- b) **Solución para la extracción de ADN:** Para digerir la muestra de Oreja se utilizó, 2.5µl de “*Proteinquinasa*” K (1mg/ml) + 47.5µl tampón de digestión (Cloruro Sódico 1M (Amresco); Tris-Hcl 1M (Amresco); EDTA pH8 1M (Amresco) y SDS 10% (Sigma)). Se utilizó 50µl por cada muestra.
- c) **TAE 10X (1litro):** Tris 0,4 M, EDTA 10 mM, ácido acético glacial 11,42 ml. Se emplea en la electroforesis de ADN.
- d) **Tampón de carga para ADN 6X (loading buffer):** azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.

- e) **Tampón marcaje para Anexina V (staining buffer):** NaCl 132 mM, KCl 3,5 mM; MgCl₂ 0,5 mM; CaCl₂ 5 mM; glucosa 10 mM y Hepes 20 mM. Ajustar a pH 7,4.
- f) **Solución de Bloqueo para Microscopio Confocal:** 5% suero de cabra (Normal Goat Serum-NGS) (Invitrogen) más 3% Albúmina de suero bovino (BSA)(Sigma). libre de ácidos grasos En inmuno-detecciones intracelulares se le añadió 0.2% Tritón (Sigma) a la solución para permeabilizar las células y/o secciones de tejido.
- g) **Tampón lisis eritrocitos:** NH₄Cl 0,15M; KHCO₃ 1mM; EDTA 0,1mM. (pH 7,4). También se utilizó la solución comercial **BD Pharm Lyse™** (BD Bioscience) según las indicaciones del fabricante.
- h) **Tampón para marcaje de Proliferación (BrdU-Staining Buffer):** Dulbecco's PBS suplementado con 3% suero fetal bovino inactivado y 0.09% (w/v) Azida.
- i) **Medio de Congelación para el timo:** Se utilizó según indicado por la casa comercial Tissue-Tek® O.C.T™.

3.1.4 Reactivos para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- a) ADN proveniente de muestra oreja
- b) Tag-Polimerasa (Biotools). Utilizado para amplificar determinadas secuencias de ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa.
- c) Solución para los deoxiribonucleótidos (4 dNTPs Mix-Biotools). A una concentración de 10mM en agua ultra pura. Se utilizaron según las instrucciones del fabricante.
- d) Tampón de reacción "Taq Mix": 0.15µl Taq Polimerasa por muestra, 3µl Taq buffer (10X) por muestra y 4µl Agua destilada DNase/RNase Free (Gibco) por muestra.
- e) Tampón de reacción "Master Mix": 0.6µl de oligonucleótidos (20µM) por muestra, 0.6µl de la solución "4 mix dNTPs" (Bioron) por muestra, 1.2µl de MgCl₂, y 18.72µl Agua destilada DNase/RNase Free (Gibco) por muestra.

- f) Agua DEPC ultra pura (tratada con diethylpyrocarbonate), se utilizó para diluir los Oligos y para evitar presencia de RNase.
- g) Tubos para reacciones PCR
- h) Agarosa preparada al 1.8% (Amresco)
- i) Bromuro de etidio (Sigma)
- j) Buffer de Carga

3.1.5 Reactivos para la Reacción Cuantitativa en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)

- a) qScript cDNA Super Mix para síntesis de hebra complementaria (Quanta Bioscience)
- b) Tiras de Tubos de 0.2ml de perfil bajo (low profile strip tube)(BioRad™)
- c) Tiras de tapas ópticas para tubos 0.2ml perfil bajo (Cap Strips)(BioRad™)
- d) Sso Fast™ Eva Green ® Supermix fluorocromo utilizado para la cuantificación (BioRad™)
- e) Agua MilliQ Pura
- f) Bromuro de etidio (Sigma)

3.1.6 Tablas de Oligonucleótidos utilizados

Todos los oligonucleótidos utilizados en las técnicas de biología molecular (PCR, RT-PCR) fueron sintetizados por el “Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos” del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC), Granada.

3.1.6.1 Oligos empleados para el genotipaje de las líneas de ratones transgénicas.

Secuencia para identificar el c-Myc	
Fw	5' AAC-AAA-CTA-CGG-CAA-AGC-TTC-AGG 3'
Rv	5' CTT-CTC-CCG-CTT-CTG-TTT-ACG-CTC 3'

3.1.6.2 Oligos empleados para el análisis del receptor S1P₁ mediante la técnica de RT-PCR en timocitos

S1P₁	
FW	GTC-TAG-ACC-CAG-AGT-CCT-GCG
RV	AGC-TTT-TCC-TTG-GCT-GGA-GAG

β-Actina utilizado para normalizar niveles	
FW	5' TGT-TTG-AGA-CCT-TCA-ACA-CC 3'
RV	5' TAG-GAG-CCA-GAG-CAG-TAA-TC 3'

3.1.6.3 Parámetros utilizados en el Termociclador para las reacciones de PCR y qRT-PCR

3.1.6.3.1 Programa utilizado para PCR convencional

Temperatura C °	Tiempo	42 ciclos
95	1min	
95	30seg	
61	1min	
72	1:30	
72	7min	

3.1.7 Lista de Anticuerpos

3.1.7.1 Anticuerpos y Reactivos para inmuno-detecciones de tejidos visualizados por Microscopía Confocal.

- a) Anti-Citoqueratina acoplado a isotiocianato de fluoresceína (Fitc) (clon C-11, Sigma)
- b) Alexa Fluor® 555 Protein Labelin Kit (Invitrogen #A20174)
- c) Anti-TCR acoplado a Alexa Fluor® 555
- d) Streptavidin acoplado a Alexa Fluor® 555
- e) Anti-CD4 acoplado a Alexa Fluor® 555
- f) Anti-CD4 acoplado a Biotina
- g) Anti-CD8 acoplado a Alexa Fluor® 647 (clon53-6.7, BD Biosciencie)
- h) Anti-CD8 acoplado a Biotina
- i) Anti-CD103 acoplado a Fitc (clon 2E7, eBioscience)
- j) Anti-CD103 Purificado (sin Azida ni endotoxinas) (clon 2E7, eBioscience)
- k) Anti-Caderina E acoplado a Fitc (clon 36/E-Cadherin, BD Bioscience)
- l) Bolígrafo de Cera (Wax Pen) (Z377821 Sigma)
- m) Poly-L-lysine Hydorbromide, utilizado como el “sustrato” de adhesión para las células en suspensión
- n) Reactivo ProLong® Gold Antifade Reagent. Medio de Montaje utilizado para sellar el portaobjeto y las inmuno-detecciones (Molecular Probes-Invitrogen)

3.1.7.2 Anticuerpos utilizados para Inmuno-detecciones de Citometría de Flujo

- a) Anti-cMyc Tag acoplado a Fitc (clon 9E10, Upstate)
- b) Anti-cMyc Tag acoplado a Fitc (clon 9E10, Sigma)
- c) Anti-TCR cadena β acoplado a Pe-Cy5 (clon H57-597, BD Bioscience)
- d) Estreptavidina acoplado a Perc-Cyc (BD Bioscience)
- e) Anti-CD62L acoplado a Biotina (MEL-14, BD Bioscience)
- f) Anti-CD62L acoplado APC (MEL-14, eBioscience)
- g) Anti-CD103 acoplado a Fitc (clon M290, BD Bioscience)
- h) Anti-CD103 acoplado a Fitc (clon 2E7, eBioscience)
- i) Anti-CD103 Purificado (no Azida ni endotoxinas)(clon 2E7, eBioscience)
- j) Anti-CD4 acoplados a Fitc o PE (clon RMA4-4, eBioscience)
- k) Anti-CD4 acoplado a APC (clon GK1.5, eBioscience)
- l) Anti-CD8 acoplados a Fitc, PE, o PE-Cyc5 (clon 53-6.7, eBioscience)
- m) Anti-CD69 acoplado a Fitc (clon H1.2F3, eBioscience)
- n) Estreptavidina acoplada a APC (eBioscience)
- o) Anti-CCR9 acoplado a Fitc (clon eBioCW-1.2, eBioscience)
- p) Anti-CD49d (reconoce cadena $\alpha 4$ de la integrina VLA-4) acoplado a Fitc (clon R1-2, eBioscience)
- q) Anti-LAP (reconoce la isoforma precursora de TGF- β_1) acoplado a PercP-eFluor 710 (clon TW7-16B4, eBioscience)
- r) Anti-CD11a acoplado a Fict (clon M17/4, eBioscience)
- s) Anti-LPAM-1 acoplado a Pe (clon DATK32, eBioscience)
- t) Kit BrdU Flow, Anti-BrdU acoplado a Fitc (BD Pharmingen™ /BD Bioscience)
- u) Reactivo BrdU para marcaje nuclear (Sigma-B5002)
- v) Reactivo DNaseI para la digestión ADN (Sigma)

w) Anti-Anexina V acoplado a Fite o APC

3.1.8 Materiales y reactivos para la extracción de linfocitos epiteliales (IEL) del intestino y de la Lamina Propia (LPL)

- a) Bisturí
- b) Jeringas
- c) Portas esmerilados
- d) Placas Petri
- e) PBS 1X complementado con Estreptomicina y Penicilina
- f) Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), no rojo fenol, no magnesio, no calico, suplementado con Tris 2,5mM, EDTA 2mM, Dithiothreitol (DTT) 5mM por cada 100ml de HBSS
- g) Tubos cónicos de 25 y 50ml
- h) Solución salina NaCl al 9%
- i) Percoll® pH 8.5-9.5, (Sigma P1644)

3.1.9 Materiales y reactivos utilizados para prueba de Adhesión celular

- a) Colágeno (Collagen from Calf Skin) (Sigma-C9791)
- b) Carboxy fluorescein succinimidyl ester (CSFE) (Sigma)
- c) Placas de 24 pocillos fondo plano (Nunc)
- d) Suero de Albumina Bovino (BSA) (Sigma)
- e) Tampón fosfato salino (PBS-1X)

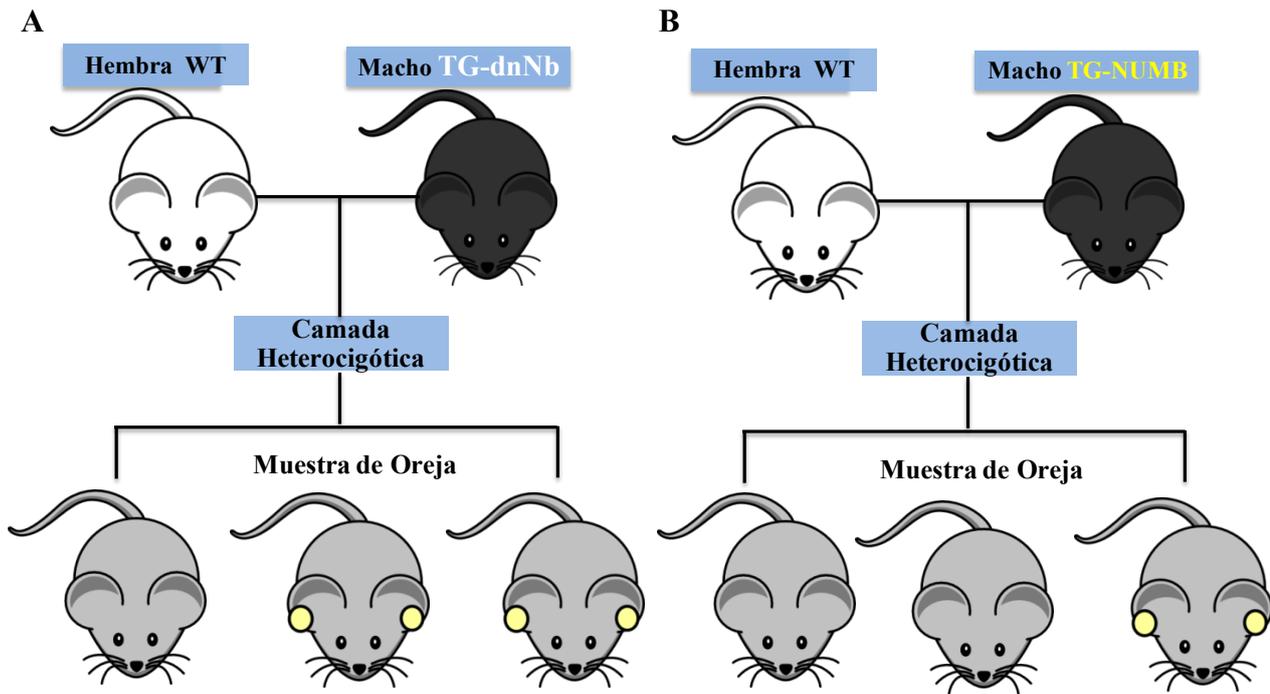
3.2 Métodos

3.2.1 Producción y Mantenimiento de Ratones

3.2.1.1 Cruce de Ratones e Identificación de ratones transgénicos

Los ratones utilizados en este trabajo son el resultado del cruce entre una hembra WT y un macho TG-dnNb o TG-Numb (Figura 2M) obteniendo una descendencia heterocigótica, por tal razón era necesario el genotipaje de todos los ratones nacido de cada camada. Para la extracción del ADN genómico se utilizó como fuente una muestra de oreja que fue digerida durante dos horas en un bloque térmico (thermo-blot) a una temperatura de 55°C, agitación a 1300 rpm en un volumen final de 50µl del buffer de digestión por cada muestra de oreja. Transcurrido la digestión, el volumen fue completado hasta 450µl con agua DEPC ultra pura para la inactivación de las RNAsas. Para la amplificación del ADN utilizamos la PCR convencional en un volumen final de 30µl. La mezcla de reacción contenía: 2µl ADN más 28µl buffer de reacción (0.15µl de DNA polimerasa, 0.6µl de una mezcla para dNTPs, 0.6µl de cada cebador, 1.2µl MgCl₂, 3µl de tampón de reacción y 22.7µl agua milliQ estéril) por cada muestra.

El producto de esta amplificación es un fragmento de ADN de un tamaño correspondiente a 600pb que se encuentra únicamente dentro de nuestra secuencia c-Myc Tag. Siendo detectada solo por los ratones transgénicos. Los parámetros utilizados para el termociclador se describen en la sección 3.1.6.3 de Materiales. El porcentaje de agarosa utilizado para esta electroforesis fue de 1.8% en un volumen de 150ml y un voltaje de 120. La agarosa se disuelve en TAE 1X y se adiciona 0,5µg/ml de bromuro de etidio para poder visualizar el ADN tras exponerlo a la luz UV.



□ **Fig.2M Esquema cruces de ratones utilizados.**

Un ratón hembra WT es cruzado con un ratón macho transgénico de la línea de interés. Los ratones positivos para el dominante negativo (círculo amarillo en oreja) son identificada mediante la técnica de PCR. (A) Línea Transgénica TG-dnNb. (B) Línea Transgénica TG-NUMB.

3.2.2 *Extracción de órganos y células.*

Los ratones que se utilizaron tenían entre 4 a 12 semanas de edad. De no ser especificado lo contrario, los ratones fueron sacrificados utilizando la técnica de dislocación cervical por el Servicio de Animalario del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC), Granada. Los ratones fueron disertados y los órganos (timo, bazo, nódulos) fueron removidos. Estos órganos se colocaban en una placa Petri pequeña con 5ml de medio 199 en hielo. Luego de extraer el timo, fue disgregado por presión utilizando dos portaobjetos. Las timocitos en suspensión fueron filtradas por un filtro “Nylon Mesh” (Millipore) con poros de 0.2µm de diámetro. Se centrifugaron por 5 minutos a 1,200-1,300 rpm, el sobrenadante fue

descartado y se añadió 5ml de medio 199 completo. Finalmente se prosiguió a un conteo celular, vía hemacitómetro.

Para obtener los linfocitos alojados en los nódulos y el bazo se utilizó el mismo protocolo. En el bazo se aumentó el número de filtrados por el Nylon Mesh (a dos o tres), debido a todas las impurezas asociadas a su disgregación. Para recolectar linfocitos de la sangre se utilizó el “lagrimal” del ojo, tomando como ventaja el volumen recuperado.

Los tubos de recogida tenían 100-200 μ l de heparina como anticoagulante. Posteriormente los eritrocitos fueron eliminados siguiendo las instrucciones del buffer lisis comercial por 5 min en hielo o con cloruro de amonio 10mins a 4°C según la literatura [84]. Luego del conteo celular las células se mantuvieron en hielo y/o a 4°C hasta su respectivo uso.

3.2.3 Congelación del Tejido del Timo.

Los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO₂, evitando cualquier daño al timo por una muerte cervical. El timo fue removido lentamente evitando cualquier ruptura y se limpió en una placa Petri pequeña con PBS-1X frío. Se fijó en paraformaldehído (PFA) (Panreac) 4% en agua MiliQ Ultra Pura en una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente (RT). Se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno en PBS-1X a 4°C. Luego, el timo se sumergió en un microtubo (Eppendorf) de 1.5ml que contenía una solución de PBS-20% sacarosa (Sigma) por una hora en movimiento circular a 4°C. El volumen final de esta solución era aproximadamente 1ml asegurándonos que el timo quedara sumergido por completo.

Después se lavó dos veces 5 minutos con PBS-1X a 4°C en movimiento circular. El timo se retiró del microtubo con pinzas de punta ancha lentamente para prevenir cualquier ruptura y se secó el timo apoyándolo varios segundos por ambos

lados en “Kimwipe”, quitando el exceso de PBS. Una vez seco el timo fue colocado lo más estirado posible en un criomolde de congelación que se llenó con el medio de congelación Tissue-Tek® O.C.T™ y se sumergió en un vaso de precipitados con 2-metilbutano (Sigma) y hielo seco hasta que el medio se congeló. Finalmente fueron guardados a -80°C hasta el momento de su corte. El timo fue cortado y procesado por la unidad preparación de muestras del Centro de Instrumentación Científica de la UGR. Tres a cuatro secciones fueron colocadas por cada portaobjetos, nuevamente se congelaron a -80°C hasta su momento de uso.

3.2.4 Inmuno-detecciones en tejidos congelados de Timo para su visualización por Microscopio Confocal

Para utilizar las secciones de timo congeladas se dejan 30-45min a RT para su descongelación, eliminando cualquier residuo de agua con “Kimwipes”. Como modo de precaución y para evitar que las incubaciones con los anticuerpos se cruzaran entre las secciones del portaobjeto se trazó unos bordes (1-2 capas) de cera alrededor de cada sección y se dejó secar por 10-15 min. Las secciones secas se lavaron con PBS 1X en un recipiente de cristal (*Coplin Jar*) por 5 min. Luego cada sección se fijó con 200µl de PFA 4% por 15 minutos a RT, y se lavaron dos veces por 3 min con PBS 1X.

Para eliminar cualquier exceso de PFA las secciones se incubaron con 200µl de NH₄CL 50mM por 10min a RT y se lavaron 2 veces con PBS 1X por 5min a RT. Se bloquearon las secciones con 100µl de solución de bloqueo por 1 hora a RT. En el caso de las tinciones intracelulares las secciones se permeabilizaron añadiendo 0.2% Tritón a la solución bloqueadora. Los anticuerpos para las incubaciones fueron preparados en la solución de bloqueo y se utilizó un volumen final de 30µl por cada anticuerpo a sus respectivas diluciones. Las secciones con incubaciones sencillas se utilizaron como control del anticuerpo y las secciones con las múltiples inmuno-

detecciones como secciones muestras. Luego de echar los respectivos anticuerpos (Sección 3.1.7.1 Materiales) a cada sección se incubaron por 4-5 horas a RT.

Se realizó 3 lavados de 10mins cada uno en oscuridad colocando 200µl por sección (al tener la cera alrededor se forma una gota) de PBS a RT. En el caso de utilizar anticuerpos secundarios se repitió el mismo procedimiento de incubación y lavado. Para finalizar la preparación el medio de montaje fue preparado según las instrucciones del fabricante. Una vez completadas las inmuno-detecciones en los tejidos se colocó una gota del medio de montaje y un cubreobjetos para sellar el portaobjeto. Se deja secando con un desecante de sílice (*Drierite*). Al otro día se retiran de la sílice y están listas para su análisis en el microscopio.

Las tinciones fueron visualizadas con el equipo Leica TCS SP5 bajo un objetivo de 63x. Las fotos y montaje de figura fueron preparadas con el programa Adobe Photoshop CS3.

3.2.5 Marcaje Celular por Citometría de Flujo para el estudio de sub-poblaciones, receptores y marcadores superficiales.

Para cuantificar los números totales de las poblaciones CD4SP y CD8SP utilizamos la citometría de flujo. En este ensayo se utilizaron ratones de 4, 8 y 12 semanas de edad. Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Para cada muestra analizada por el citometro se utilizó como mínimo una concentración de 1×10^6 timocitos que fueron lavados con 500µl PBS-1X 5min a 1,200 rpm para eliminar cualquier residuo del medio de cultivo, dejando solamente los timocitos en el tubo. Al utilizar un anticuerpo frente al receptor TCR realizamos la incubación de todos los anticuerpos en hielo, evitando una activación celular (mediada por TCR) que pudiera alterar el resultado final del estudio. Con este anticuerpo en específico nos aseguramos de reconocer las células más avanzadas en su maduración (TCR^{high}).

Los anticuerpos (Sección 3.1.7.2 Materiales) se utilizaron a una proporción de 10µl/millón de células de sus respectivas diluciones. Los timocitos se incubaron con los siguientes anticuerpos: α -TCR, α -CD4 y α -CD8 y por un periodo de 10-15 minutos hielo/4°C a oscuras. Nuevamente fueron lavados con 500µl PBS 1X, el sobrenadante fue descartado y se re-suspendieron en 500µl PBS para ser analizadas. Incubaciones para anticuerpos secundarios se realizó el mismo procedimiento, un lavado con PBS-1X e incubación. Las muestras fueron procesadas por un FACS Calibur BD.

Los resultados fueron analizados con el programa FlowJo versión 7.6.1. y las gráficas fueron realizadas con el mismo programa.

3.2.6 Marcaje Intracelular para la detección de la proliferación celular (BrdU) y para los niveles de expresión de proteínas

3.2.6.1 Ensayo de proliferación en timocitos y protocolo de tratamiento a ratones

La proliferación celular fue analizada mediante la incorporación del compuesto bromodeoxiuridina (BrdU) en la síntesis de hebras nuevas por su característica de ser análogo de timidina. Los ratones utilizados para este estudio fueron de 12 semanas de edad, se les inyectó 100µl intraperitoneal (i.p) dos veces al día con un intervalo de 4 horas entre dosis por un periodo de 3 días. La concentración de BrdU utilizada fue de 10mg/ml [85, 86].

La razón de división celular en los timocitos se detectó por un análisis de BrdU. Para la tinción intracelular se utilizó el kit BD Pharmingen™ BrdU Flow según el protocolo recomendado por el fabricante. Para este experimento se utilizaron entre $1-2 \times 10^6$ de timocitos y se realizaron las inmuno-detecciones superficial primero. Las incubaciones fueron frente los receptores TCR, CD4 y CD8

usando un volumen de 50µl/anticuerpo preparados en el tampón de tinción (staining buffer).

Los timocitos fueron incubados a oscuras en hielo 15 minutos, luego se lavaron con 1ml del “staining buffer” y se centrifugaron 5mins a 200-300g a 4°C. El sobrenadante fue descartado y se empezó la fijación y permeabilización de los timocitos. Los timocitos fueron re-suspendidos en 100µl de BD Cytofix/Cytoperm™ Buffer e incubados de 15-30mins en hielo. Se realizó un lavado con 1ml de BD Perm/Wash™ Buffer. Luego se re-suspendieron en 100µl de Cytoperm Plus Buffer e incubadas por 10min en hielo.

Se realizó un lavado igual al anterior y se prosiguió a una re-fijación con 100µl de BD Cytofix/Cytoperm™ Buffer por 5mins en hielo y su posterior lavado. Para la separación de las hebras de ADN los timocitos se incubaron 1hora a 37°C con 100µl de DNase diluida a una concentración de 300µg/ml, al finalizar la incubación se realizó un lavado. Finalmente se incubaron los timocitos con el anti-BdrU-Fitc a una dilución 1:50 en 50µl de BD Perm/Wash Buffer con un tiempo de incubación de 20mins a RT a oscuras. Después del lavado final las células fueron re-suspendidas en staining buffer y las muestras procesadas por citometría.

3.2.6.2 Ensayo para la detección de niveles de expresión para receptores y proteínas superficiales.

El estudio de la expresión de las moléculas de adhesión (integrinas) se realizó siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente, omitiendo los pasos para el tratamiento con DNase ya que era irrelevante. Para este experimento utilizamos un anticuerpo anti-αEβ7 (CD103), el cual también fue preparado en el tampón de tinción (staining buffer). La expresión de CD103 fue analizada en células con niveles TCR^{high}, la cual corresponde a la población madura de los timocitos.

3.2.7 Estudio de la Modulación de receptores superficiales

3.2.7.1 Estudio de la internalización del receptor superficial CD69

Para estudiar la capacidad de regulación en los timocitos de los ratones TG-dnNb y compararlos con ratones WT, realizamos una dinámica de expresión superficial para el receptor CD69. Todas las extracción del timo, disgregación del órgano y manipulación de timocitos (marcaje de CD69 solamente) fueron en condiciones estériles. Utilizando una placa de cultivo (48 pocillos) se incubaron timocitos totales durante diferentes periodos de tiempo (0, 3, 6 y 9 horas) a 37°C y 5% CO₂ con medio de cultivo RPMI-Completo.

Completado el tiempo de incubación los timocitos fueron recolectados y se terminó las inmuno-detecciones superficiales para los siguientes receptores: α -TCR, α -CD4 y α -CD8. Estas inmuno-detecciones se realizaron después del periodo de incubación para evitar que el anticuerpo de TCR activara las células. Induciendo cambios en la expresión de CD69. Para analizar los niveles de expresión superficial la población CD8⁺TCR^{high} fue la elegida nuevamente. Se realizaron ensayos triplicados para cada punto.

3.2.8 Extracción de ARN Mensajero y análisis de S1P₁ por RT-qPCR Cuantitativa

Para la cuantificación del ARN mensajero que codifica para el receptor S1P₁ utilizamos la población de timocitos totales de ratones de 12 semanas de edad. Las células fueron tratadas y lisadas por Unidad de Genómica y síntesis de ADN del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra. La extracción del ARN mensajero fue por el equipo automatizado Qiacube (Qiagen). Utilizando la técnica de retrotranscripción para sintetizar el ADN complementario (ADNc). Se utilizó 1µl de ADNc como molde para los ensayos de qPCR.

Se empleó el Sso Fast™ Eva Green ® Supermix (Quanta Bioscience). Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 30µl y se siguieron las recomendaciones del fabricante. Los valores fueron normalizados con el gen de referencia β -actina. Se realizaron ensayos por triplicado para cada muestra. El equipo utilizado para llevar a cabo la reacción fue CFX96 (BioRad). Las condiciones para la PCR se ajustaron según el experimento y se presentan a continuación.

3.2.9 Estudio de Adhesión celular *in vitro* a la proteína de la matriz extracelular Colágeno, para los timocitos totales.

Para estudiar y comparar la capacidad de adhesión celular en los timocitos a las proteínas de la matriz extracelular (ECM) utilizamos como sustrato en este experimento a colágeno, una de las proteínas más expresada en la ECM. Brevemente, se utilizaron timocitos totales extraídos en condiciones estériles y una placa de cultivo (48 pocillos) previamente tratada con colágeno. La capacidad de adhesión celular fue estudiada mediante la fluorescencia emitida por las células adheridas a la placa.

Un día antes del ensayo la placa era tratada, los pocillos fueron rellenos con 150-200µl de colágeno (20µg/ml) y se dejó incubando a 4C° toda la noche. Al día siguiente se hizo un lavado a la placa con 200µl de PBS-1X y una leve agitación, removiendo cualquier residuo (exceso) de colágeno sin adherir a la placa. Finalmente y para evitar uniones inespecíficas se realizó un bloqueo para los espacios libres (sin colágeno) incubando la placa con 200µl de BSA 1% caliente (desnaturalizado) por 1hora a RT. Se lavaron los pocillos 3 veces con PBS-1X, dando por terminado el tratamiento a la placa.

Una vez los timocitos estuvieran en suspensión celular fueron lavados dos veces con 500µl de PBS 1X-BSA 0.1% desnaturalizado, para remover cualquier

residuo del suero fetal bovino del medio de cultivo. Se incubaron con 2 μ l del reactivo “Carboxy fluorescein succinimidyl ester” (CSFE) a 5mM por 15min a 37°C y se lavaron dos veces con RPMI Completo. Fueron re-suspendidos en RPMI Completo y se calcularon 2 x10⁵ timocitos en 50 μ l por pocillos. La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C 5% CO₂.

Finalizada la incubación se retiró el medio de los pocillos y se lavaron 3 veces con medio de cultivo fresco utilizando una pipeta normal o multi-well, sin tocar el fondo de los pocillos con la punta, evitando cualquier contacto o desprendimiento de las células. Para excitar y detectar el CSFE se utilizó el lector de placas Infinite 200 (Tecan) y se hizo una lectura a un largo de onda de 488nm. Las gráficas son representativas de al menos 4 experimentos por separado.

3.2.10 Extracción de Linfocitos Intraepiteliales (IEL) y Lamina Propia (LPL) del intestino.

Para estudiar una posible alteración en la ruta de migración en los ratones TG-dnNb inducida por la presencia del dnNb, estudiamos los porcentajes de las poblaciones de linfocitos alojados en el intestino. Ratones de 12 semanas de edad fueron sacrificados por inhalación CO₂ y la extracción del intestino se realizó en condiciones no estériles. Las inmuno-detecciones realizadas fueron frente los receptores: TCR $\alpha\beta$, CD8 $\alpha\beta$, CD4 y la integrinas CD103. Se utilizó la citometría de flujo para obtener los porcentajes de cada población y los números absolutos fueron calculados partiendo de esos porcentajes como base.

Para las extracciones de los linfocitos IEL alojados en el intestino se utilizó el siguiente protocolo (modificación del artículo Gautreaux *et al.* [87]). Se limpió el intestino de toda la grasa posible y las Placas de Peyer’s fueron extraídas siempre que fueran detectadas cuidadosamente intentando no romper el intestino. Se cortó y separó el intestino delgado y grueso, quitando todo el excremento posible del

interior de cada compartimiento. En una placa Petri y utilizando una jeringa fina se limpió el intestino por dentro en abundancia con PBS-1X, suplementado con antibióticos (Pen/Strep). En otra placa Petri con PBS-1X-Pen/Strep fresco el intestino fue abierto longitudinalmente y cortado en pedazos de 0.5cm con un bisturí. Los pedazos fueron re-suspendidos en 25ml del Medio de extracción e incubados por 15mins a 37°C en agitación (190 strokes). Se recolectó el sobrenadante y se repitió la incubación con medio fresco, el segundo sobrenadante se mezcló con el primero.

Finalmente, se re-suspendió el tejido en 10ml de medio de extracción, se recolectó el medio, se mezcló con los anteriores. El tejido se mantuvo en hielo para la extracción de los linfocitos de la lámina propia (LPL). La mezcla de los sobrenadantes de IEL fue centrifugada 10mins a 1,200rpm RT. Las células fueron re-suspendidas en 2-3ml de RPMI 5% FCS y filtradas por Nylon Mesh. Para aislar los linfocitos IEL, se preparó un gradiente de Percoll con fases de 67% y 44% de 2ml cada una. Las células se colocaron como última fase y se centrifugó 15min a 1,800rpm RT, asegurándonos que la centrifuga no tuviera un freno en la etapa de Stop. Las células se recolectaron de la interface “blancuzca” entre 67% y 44% utilizando una pipeta Pasteur plástico, se pasaron a medio fresco y se prosiguió a su conteo y marcaje superficial.

Para la extracción de los linfocitos LPL se incubó el tejido con 25ml del Medio de Extracción 2, durante 90mins a 37°C en agitación (190 strokes). El sobrenadante fue recolectado y filtrado (Nylon Mesch), el tejido fue re-suspendido con 25ml nuevo, se mezclaron ambos sobrenadantes y fueron centrifugados a 1,300rpm durante 10min a RT. Las células fueron re-suspendidas en RPMI complementado con 10%FCS, 50µM Betamercapto, Pen/Strep). Finalmente se preparó un gradiente de Percoll siguiendo las especificaciones anteriores. Las células se recolectaron de la interface “blancuzca” con una pipeta Pasteur plástico, se pasaron a medio fresco y se prosiguió a su conteo y marcaje superficial.

Resultados

4 Resultados

El sistema inmunitario es esencial para la supervivencia de cualquier especie, protegiendo al organismo de invasiones patogénicas o de alteraciones celulares internas. Las células que lo constituyen (linfocitos B y T) son las encargadas de realizar la inmuno-vigilancia. Por lo tanto, es imperativo que su desarrollo se efectúe de una forma completa y correcta. Las células T, en específico, deben completar un desarrollo correcto en el timo y lograr una migración a la periferia, realizando la entrada a los órganos periféricos como los nódulos linfáticos (nódulos Linfáticos Mesentéricos {MLN}, inguinales, Placas de Peyer {PP}, etc.), bazo, intestino o sangre, etc. Se trata de un evento importante, ya que es el lugar donde se interacciona con las células presentadoras de antígeno (APC) y/o activación celular para la respuesta inmunitaria.

Anteriormente, nuestro laboratorio demostró la participación de la proteína adaptadora Numb en el desarrollo de los timocitos. Utilizando una versión truncada de Numb (TG-dnNb), describimos alteraciones en los mecanismos de división asimétrica durante el desarrollo de los timocitos, y su participación en la degradación para el receptor de células T (TCR). De igual forma, se pudo demostrar y confirmar que, al cruzar los ratones dnNb-TG con ratones que expresan un mayor número de copias de la proteína completa (TG-Numb) se revierte el fenotipo a uno semejante a los ratones silvestres (WT). Esto último demuestra que, efectivamente, se está inhibiendo a Numb en los ratones dnNb-TG y no otras proteínas semejantes en estructura.

En el presente estudio hemos utilizado las líneas de ratones transgénicos mencionadas anteriormente con el fin de estudiar el papel de Numb en la capacidad inmunitaria de las células T. La primera línea de ratón que utilizamos expresa una construcción conteniendo un *dominante negativo de Numb* (TG-dnNb) (ver Fig.1

Materiales y Métodos). El dnNb se compone solamente del dominio de unión a fosfotirosina (PTB) de la isoforma p71 de Numb y está modulado por el promotor CD2 humano, expresándose específicamente en los precursores y células T y B. Los dominantes negativos no alteran la producción de la proteína endógena, pero si son capaces de unirse a los ligandos naturales de la proteína a inhibir, bloqueando aquellas rutas de señalización en las que participa la proteína endógena [27, 88]. La segunda línea transgénica utilizada para desarrollar este trabajo fue TG-Numb; estos ratones sobreexpresan la isoforma completa (p71) bajo el mismo promotor. Ambas construcciones son flanqueadas en el dominio PTB por la secuencia diana c-Myc tag humana, como método de reconocimiento. De esta forma, y mediante la utilización de un anticuerpo anti-Myc tag, se puede diferenciar ambas proteínas transgénica de la endógena.

4.1 Caracterización de los efectos del dnNb durante el desarrollo de los timocitos.

Todas las células deben seguir ciertos procesos básicos para completar su desarrollo y maduración correcta: la división celular (proliferación celular), diferenciación (tipo celular), entre otros. Cada uno de estos procesos constituye un punto de verificación durante el desarrollo, obteniendo como resultado final una célula óptima para realizar sus funciones. Por tal razón, y para empezar a estudiar las posibles funciones de Numb en el desarrollo de los timocitos, nuestro primer enfoque fue identificar las alteraciones inducidas por la presencia del dominante negativo.

4.1.1 La proliferación celular para la subpoblación CD8SP del timo disminuye ante la inhibición de Numb endógeno

El proceso de proliferación permite obtener una población adecuada de células en el timo, evento que facilita su funcionamiento correcto. Utilizando la técnica de incorporación de BrdU en la síntesis de hebras nuevas, fuimos capaces de

Resultados

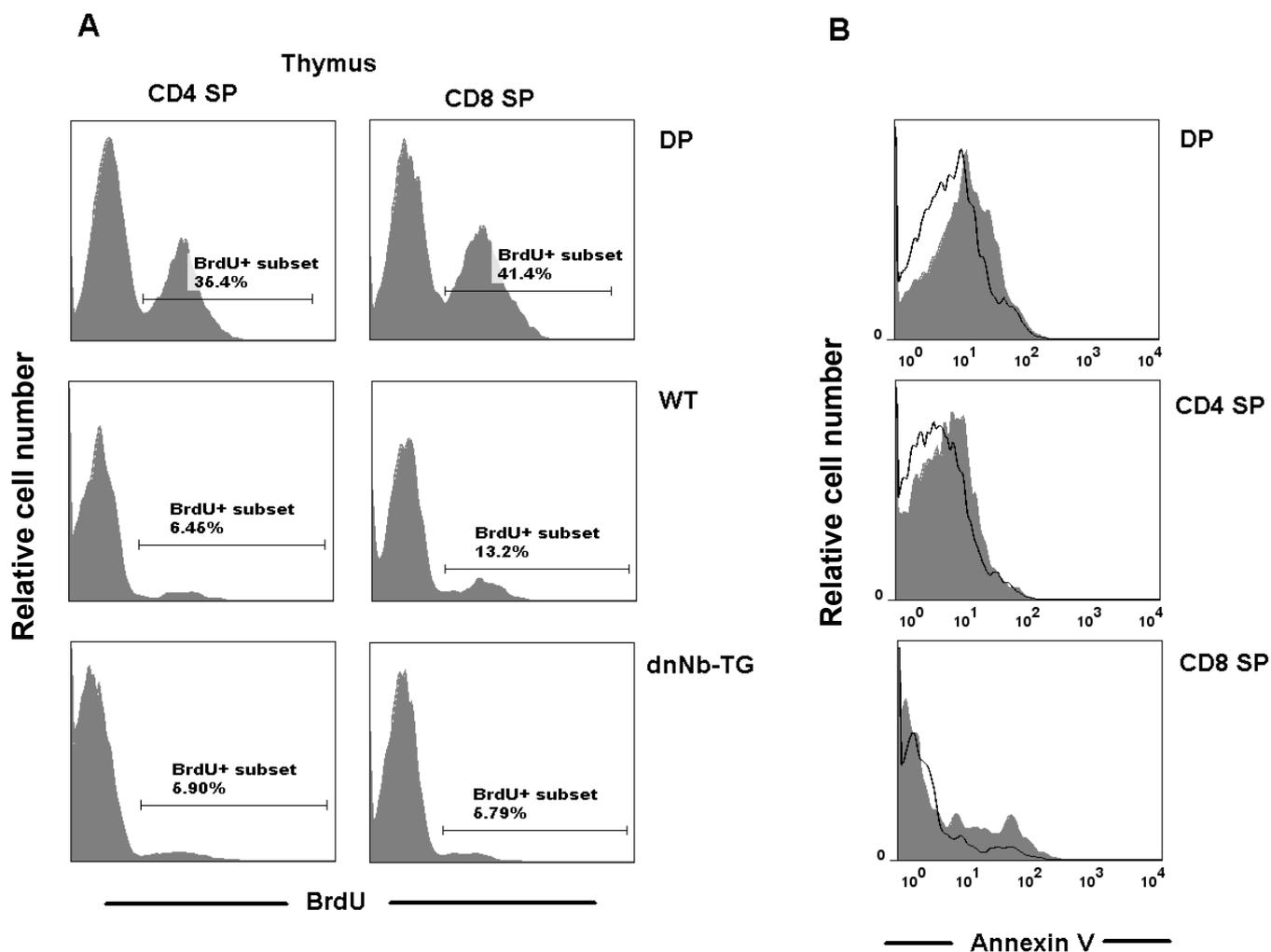
detectar cuantitativamente esta capacidad o actividad para timocitos que estuvieran en la fase Simple Positiva (SP) y confrontar los valores obtenidos. Al analizar los resultados de la tinción frente a BrdU encontramos que la población doble positiva (DP) en los ratones TG-dnNb presenta un aumento tenue en el porcentaje BrdU. Por otro lado, la población CD4SP no presenta cambios en la tasa de división, al enfrentarlo a ratones WT. Sin embargo, pudimos observar que el porcentaje de proliferación para las CD8SP en los ratones TG-dnNb disminuían significativamente, hasta 2 veces menos (13.2% vs 6.79%) al compararlos con el WT (Fig.1-A, Paneles intermedio e inferior). Este comportamiento nos podría sugerir una participación de Numb endógeno modulando negativamente la proliferación de los timocitos.

4.1.2 La muerte celular en los timocitos totales y simples positivos no se ve afectada por la modulación negativa de Numb.

Con el fin de explicar la reducción en la proliferación de los timocitos CD8SP-dnNb quisimos estudiar la posibilidad de que estos sufrieran un aumento en la muerte celular mediada por apoptosis. Para determinar si la presencia del dominante negativo induce algún efecto sobre la actividad apoptótica dentro del timo, realizamos un estudio de la molécula Anexina V en la superficie de las subpoblaciones DP, CD4SP y CD8SP.

Al comparar los niveles de expresión, detectados por citometría de flujo, no se observó un aumento superficial de Anexina V en las subpoblaciones estudiadas para los ratones TG-dnNb respecto a los WT (Fig.2-B). Los histogramas de todas las subpoblaciones en ambos ratones presentan un comportamiento similar, solapándose prácticamente por completo entre sí. Tampoco se observó un desplazamiento mayor en la intensidad (eje X) del ratón TG-dnNb en las CD8, aunque mostraban un ligero aumento en la cantidad de células en apoptosis, según se puede observar (altura de

la curva). Este comportamiento nos permite descartar una implicación de la apoptosis en la disminución de la proliferación de CD8SP-dnNb detectada.



■ **Figura 1: Efecto del dnNb en los procesos de proliferación y apoptosis en los timocitos CD4SP y CD8SP:** A. Análisis de proliferación celular utilizando la incorporación de BrdU como marcador. B. Estudio de Apoptosis en subpoblaciones marcadas con Anexina V. Ratón WT (línea continua); Ratón TG-dnNb (línea entrecortada y sombreado).

4.2 Estudio de los receptores asociados a la maduración celular en ratones TG-dnNb.

Un comportamiento adecuado del Sistema Inmunitario se basa en parte en la eficacia que presenten las células T. Para ser células óptimas, es imperativo completar su maduración tímica antes de migrar a la periferia. El estado de maduración se puede identificar según el patrón de expresión superficial en los receptores CD69, CD62L, HSA y Qa-2. Los niveles de este conjunto de receptores identifican el fenotipo de célula semi-madura y madura en los timocitos. Por lo tanto, nuestra segunda pregunta fue determinar si el dnNb posee alguna capacidad de alterar los patrones de expresión de dichos receptores.

4.2.1 Análisis del efecto del dominante negativo de Numb sobre los niveles superficiales de los marcadores de maduración.

Para definir el patrón de marcadores de maduración expresado por los timocitos TG-dnNb, realizamos distintas inmuno-detecciones de receptores superficiales, para su posterior análisis por citometría de flujo. Al examinar los resultados obtenidos, observamos que la población CD4SP posee niveles de expresión en todos los receptores acorde al patrón descrito en la literatura para catalogarse como células maduras en el WT y TG-dnNb (Fig.2-A). Por otra parte, al comparar la población CD8SP-dnNb con el ratón WT exhibe modificaciones en los niveles de expresión en dos de los cuatro receptores estudiados, específicamente CD69 y CD62L (Fig.2-A) (resumen Tabla 1). Al igual que el estudio anterior, los timocitos CD8SP-dnNb son los únicos en presentar modificaciones superficiales. Entendemos que esta alteración en los niveles superficiales es debido a un efecto, directo o indirecto, de dnNb.

La primera modificación se detectó en el receptor de activación temprana CD69. En el histograma de la primera fila en la Fig.2-A se puede observar cómo los timocitos CD8SP-WT muestran claramente dos niveles distintos de expresión superficial para CD69. Esta diferencia en los niveles superficiales se interpreta como una transición en la maduración, siendo la población madura la que expresa los niveles más bajos. Sin embargo, la presencia del dnNb en los timocitos TG-dnNb provoca que mantengan una expresión superficial alta; existiendo únicamente una población.

■ Tabla 1. **Niveles superficiales para las población simples positivas CD4 y CD8 en ratones TG-dnNb.** Resumen de niveles superficiales para los receptores según la fase de desarrollo.

<u>Fenotipos</u> <u>Celular</u>	<u>CD69</u>	<u>CD62L</u>	<u>HSA (CD24)</u>	<u>Qa-2</u>
Semi-maduras	Alto	Bajo	Alto	Alto
Maduras	Bajo	Alto	Bajo	Alto
Timocitos CD8SP-dnNb	Única población niveles <i>ALTOS</i>	Población con niveles <i>BAJOS</i>	Bajo	Alto

El segundo receptor afectado por la expresión del dominante negativo en las CD8SP-dnNb es CD62L. En este caso, y a diferencia del efecto en CD69, se pudo observar cómo los ratones TG-dnNb presentan una población con bajos niveles de CD62L (Fig.2-A Segunda Fila). Tal población no se pudo detectar en los ratones WT, siendo todas sus células positivas para este receptor, expresando los niveles correctos. Mientras tanto, los receptores HSA y Qa-2 presentan unas modificaciones

Resultados

superficiales mínimas, sugiriendo una posible disminución y una mayor expresión respectivamente. Sin embargo, consideramos que estos cambios no son significativos.

Estos datos nos podrían indicar que la expresión del dnNb induce a que los timocitos CD8SP-dnNb presenten un patrón mixto de expresión en los marcadores de maduración durante el desarrollo en el timo. Las células CD8SP de ratones TG-dnNb muestran niveles semi-maduros de CD69 y CD62L, pero niveles maduros en Qa-2 y HSA (Tabla 1). Ello nos sugiere que el dnNb podría estar alterando algún mecanismo en la regulación de CD69 en los timocitos y bloqueando *parcialmente* la expresión de CD62L.

Por lo cual, nuestros timocitos CD8SP-dnNb, estarían expresando un fenotipo atípico, que puede resultar potencialmente perjudicial para el desarrollo de células T. Además, un dato interesante es que los receptores afectados por el dnNb son los más importantes de este grupo, considerando la capacidad de controlar funciones en fases posteriores de los linfocitos.

4.2.2 Consecuencias de la expresión de dnNb sobre los receptores de migración y sobre la distribución en la periferia.

Como se mencionó anteriormente, al analizar las fases de maduración de los timocitos detectamos niveles altos de CD69, prácticamente en la totalidad de las CD8SP-dnNb (Fig.2-A). Esto nos hace preguntarnos si la presencia de dnNb puede estar afectando la capacidad de modulación superficial de este marcador por estas células. Por ello, decidimos investigar la capacidad que tienen las CD8SP-dnNb de regular esta expresión, realizando una dinámica de internalización. Los timocitos vírgenes (*naive*) fueron incubados a diferentes tiempos (0, 3, 6 y 9 horas) a 37°C en medio RPMI completo, luego se hizo una inmuno-detección contra CD69 y se estudiaron sus niveles superficial por citometría de flujo.

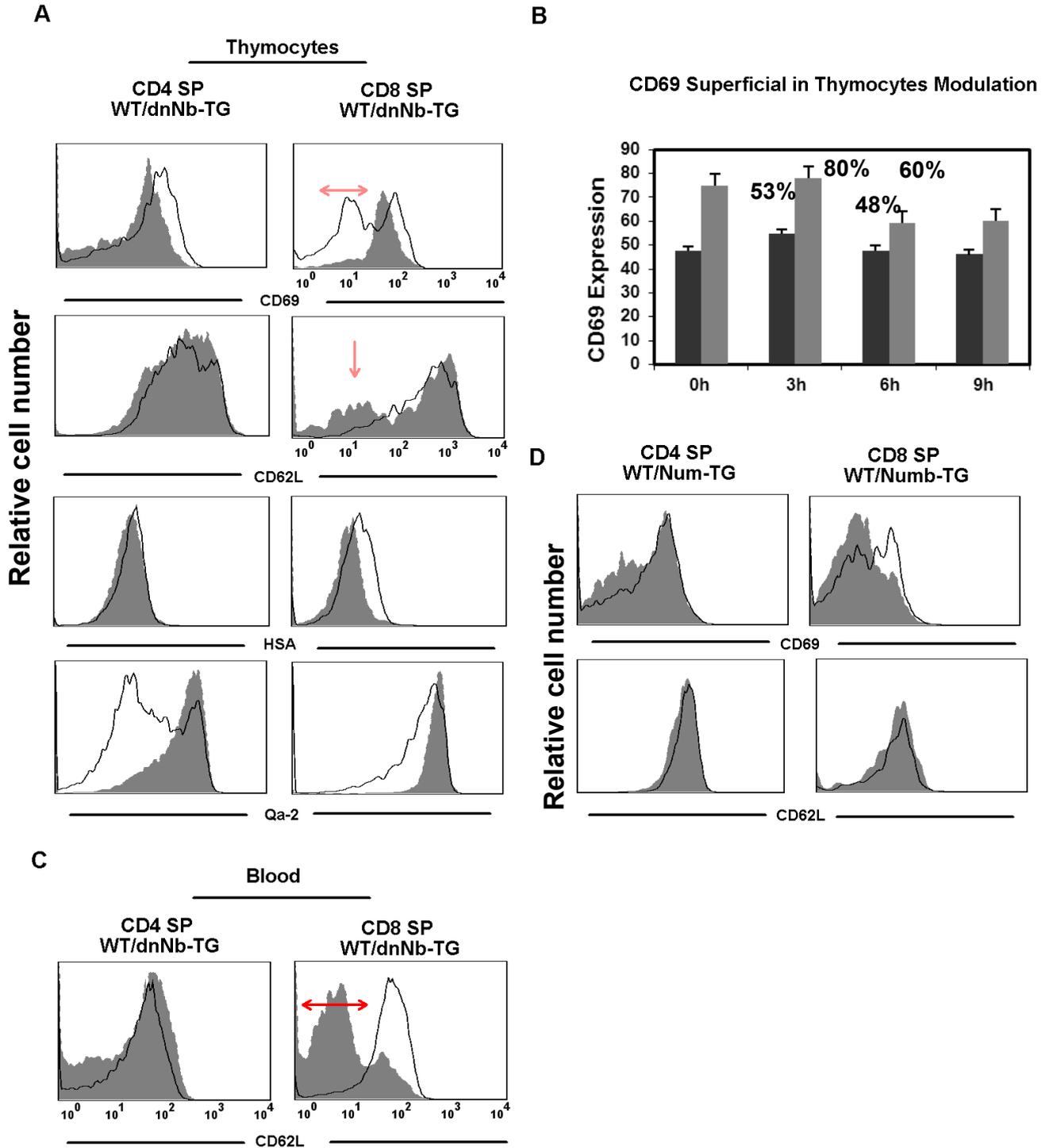
Como resultado de esta dinámica observamos que, a pesar de los altos niveles superficiales con los que empiezan las CD8SP-dnNb (tiempo 0) son capaces de desarrollar un mecanismo de internalización adecuado. De hecho, podríamos considerar que los timocitos CD8SP-dnNb tiene un lapso de mayor internalización si se comparan los porcentajes de disminución entre los puntos de 3hr con respecto a 6hr (Fig.2-B). Las células transgénicas alcanzan una disminución de hasta 4 veces más (WT 53% a 48% [-5%] y TG 80% a 60% [-20%]). Ello nos hace suponer que si el dnNb está afectando este mecanismo, no lo hace totalmente sino en un menor grado.

Por su parte, la selectina-L (CD62L), además de ser un receptor de maduración, participa en la entrada de los linfocitos a los nódulos linfáticos. Al igual que CD69, el receptor CD62L muestra una expresión transitoria según la fase en la que se encuentren las células en el timo. La presencia de una población con bajos niveles superficiales en CD8SP-dnNb sugiere que estos timocitos y futuros linfocitos pueden no ser capaces de expresar este receptor en su máxima capacidad (Fig.2-A, Segundo Panel). De igual forma, entendemos que su expresión aumentar en los linfocitos que se encuentran circulantes en la sangre. Al examinar la expresión de CD62L en esta población se observó que los linfocitos CD4 presentaban niveles adecuados para ambos ratones. Mientras tanto, los linfocitos CD8-dnNb en la sangre presentaban el mismo patrón que los timocitos, con una población en valores negativos (escala 10^0 - 10^1) (Fig.2-C). El efecto es mayor si se compara con la población y niveles de este receptor en el timo. Estos resultados nos incitan a pensar que la capacidad de los linfocitos T CD8 para entrar a los nódulos podría estar limitada en ratones dnNb.

Nuestros resultados sugieren que ambas modificaciones (CD69 y CD62L) son inducidas por la inhibición de Numb. Así, cabe pensar que la sobreexpresión de Numb podría inducir efectos contrarios en estos receptores. Para comprobar esta hipótesis realizamos las mismas inmunodetecciones en los timocitos de ratones que

Resultados

sobreexpresan Numb (TG-Numb). Se pudo observar que ambas subpoblaciones (CD4SP y CD8SP) de TG-Numb expresan niveles semejantes a las células WT, para los receptores afectados en los dnNb (Fig.2-D). Incluso se pudo detectar cómo los timocitos CD8SP del TG-Numb alcanzan un mayor número de células con disminución del receptor CD69 en comparación al WT (altura de la gráfica) (Fig.2-D).



- **Figura. 2: Alteración de los niveles superficiales de receptores de maduración y migración para timocitos CD8-dnNb:** **A.** Expresión superficial en timocitos simples positivos de ratones WT (línea continua) versus TG-dnNb (línea sombreada). Flecha roja indica la diferencia de niveles superficiales **B.** Análisis de modulación superficial (internalización) para CD69 en timocitos CD8SP, WT (Columnas negras) versus dnNb-TG (Columnas grises) **C.** Estudio del receptor CD62L para linfocitos en la sangre. **D.** Análisis superficial de los receptores CD69 y CD62L en ratones WT versus Numb-TG (línea sombreada) en timocitos totales.

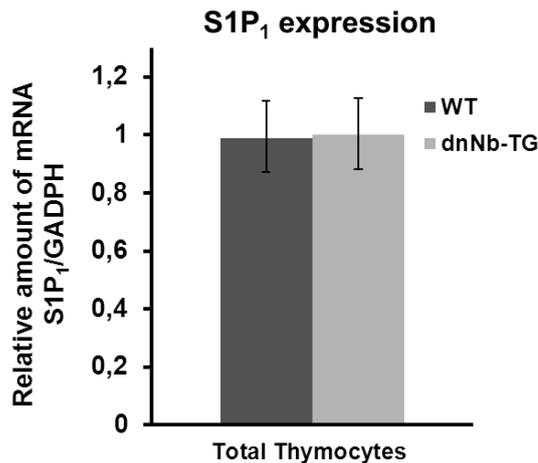
4.2.3 Estudio de la expresión de receptores de esfingolípidos en timocitos totales

El receptor CD69 es un receptor asociado a la maduración y regulación de la migración desde el timo, también se le ha vinculado en las últimas décadas con la modulación de otros receptores (CCR7, CCR9 entre otros). Dentro de esta modulación se incluye su relación antagonista con los receptores para esfingolípidos (S1P₁₋₄), de los cuales las isoformas 1 y 4 se expresan en las células T. Estas isoformas, al igual que CD69, están estrechamente relacionadas con la capacidad de migración de los timocitos. Se ha demostrado que ratones con alguna modificación en la expresión o un gen KO para los receptores S1P_{1,4} exhiben dificultades al salir del timo, similar a ratones con problemas en la modulación de CD69. Nuestros resultados demuestran una sobreexpresión continua de CD69, creando la posibilidad de que estos niveles sean capaces de alterar la cascada de señalización a través del receptor S1P₁ para las células CD8SP-dnNb.

Para abordar esta posibilidad estudiamos la expresión del receptor S1P₁, utilizando la técnica cuantitativa de qRT-PCR. El análisis de expresión superficial en los timocitos totales (células DP, CD4SP y CD8SP) indica que los ratones TG-dnNb expresan unos niveles similares al compararlos con los ratones WT (Fig.3). La cuantificación del ARNm en los timocitos totales nos sugiere que la sobreexpresión de CD69 inducida por el dominante negativo de Numb, no afecta los niveles

Resultados

superficiales de S1P₁. Entendemos que al presentar S1P₁ unos niveles cuantitativos paralelos a los ratones WT, su funcionalidad en los ratones TG-dnNb no debe ser alterada. Sin embargo, estudios más específicos y funcionales serían necesarios para apoyar a esa conclusión.



■ **Figura. 3: El dominante negativo no altera los niveles relativos de ARNm para el receptor S1P₁ en timocitos totales:** Diagrama de barras para los timocitos totales de ratones WT (Columna negra) respecto ratones dnNb-TG (Columna gris).

4.2.4 Receptores de Quimioquinas

Otros marcadores a los que se ha asociado con una participación en la migración de los timocitos son los receptores de quimioquinas. Se ha visto que timocitos CD69⁺ tienen un mayor reconocimiento y migración al ligando de Quemoquina 25 (CCL25 por sus siglas en ingles), interacción que está mediado por su receptor CCR9. Nuestros ratones TG-dnNb al mostrar unos altos niveles constitutivo de la expresión de CD69 en sus timocitos, podrían presentar un aumento en el reconocimiento a CCL25, aumentando los niveles de CCR9.

Para probar esta hipótesis realizamos una inmunodetección superficial frente a CCR9 y medimos la expresión por citometría de flujo (Fig.4). Al comparar los niveles superficiales del TG-dnNb con respecto al WT no se detectó ningún aumento en los niveles superficiales como consecuencia directa de los niveles del receptor CD69. Ello nos sugiere que nuestro dominante negativo afecta principalmente a CD69 y CD62L, sin lograr alterar la expresión superficial de los receptores S1P₁ ni CCR9.

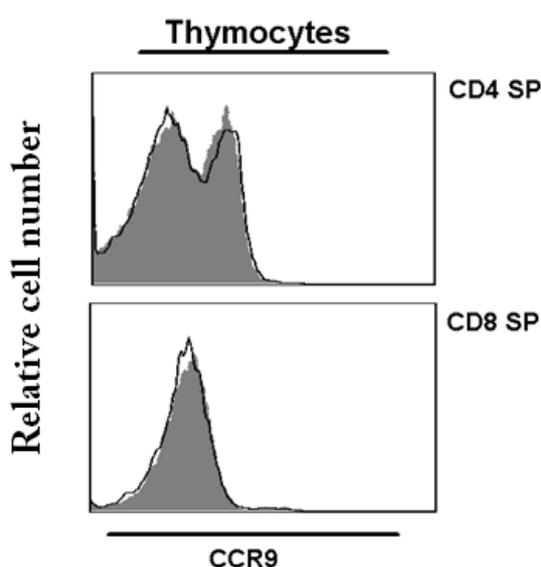


Figura. 4: Fenotipo del receptor para quimioquinas CCR9 en ratones TG-dnNb: Expresión superficial en timocitos simple positivos. Ratones WT (línea continua) versus TG-dnNb (línea entrecortada y sombreada).

4.2.5 *Análisis de la distribución de linfocitos CD8SP-dnNb con fenotipo mixto en los órganos secundarios.*

Con el conjunto de resultados expuestos hasta el momento demostramos que la expresión de Numb dominante negativo, altera el comportamiento de los timocitos CD8SP durante su desarrollo y maduración. Ello puede modificar específicamente la presencia de esta población en los órganos linfoides secundarios (periféricos). Para estudiar el posible efecto inducido por la presencia de dnNb en los diferentes órganos secundarios (nódulos linfáticos, bazo) (SLO's) del sistema inmunitario y en la sangre, estudiamos la capacidad en las subpoblaciones de linfocitos de poblar dichos órganos.

Resultados

Al analizar el comportamiento de los linfocitos en la periferia, logramos identificar una tendencia en los ratones TG-dnNb a presentar una disminución en la presencia de linfocitos T CD8, tanto en la sangre como en los órganos secundarios (Fig.5 A, B, C). Los nódulos linfáticos (LN) en general (unión de nódulos inguinales, axilares y cervicales) son los órganos que presentan la disminución más significativa, de hasta 10 veces menos (WT 20.3% vs TG-dnNb 1.99%). Lo cual se confirmó calculando los números absolutos de linfocitos T CD8, observándose el mismo patrón de disminución con una diferencia significativa de $p < 0,05$ tanto en bazo como en nódulos (Fig.5-B,C).

De igual forma, al estudiar la población T CD8-dnNb en compartimientos más específicos como los ganglios Linfáticos Mesentéricos (MLN) o Placas de Peyer (PP) que forman el “Gut-associated lymphoid tissue” (GALT) se pudo observar el mismo patrón (Fig.5-D, E). Sin embargo, la disminución presentada en las PP es insignificante, presentando unos porcentajes similares.

Un aumento en la tasa de apoptosis en los órganos periféricos podría favorecer la reducción observada de linfocitos T CD8-dnNb en estos órganos secundarios. Para indagar esta hipótesis medimos la actividad apoptótica en el conjunto de los nódulos linfáticos (órganos más afectados) utilizando la misma técnica que se utilizó en el timo. Al analizar los niveles de Anexina-V logramos detectar un aumento moderado tanto en la intensidad apoptótica (Eje X) como en el número de células (Eje Y) en los linfocitos CD8-dnNb (Fig.5-F). Este aumento presentado en la apoptosis podría ser un factor a contribuir en la disminución periférica. Sin embargo, entendemos que la diferencia presentada en la actividad apoptótica no es lo suficiente para ser la causa principal, sino más bien un factor complementario a las alteraciones que afectan a los receptores CD69 y CD62L en el timo.

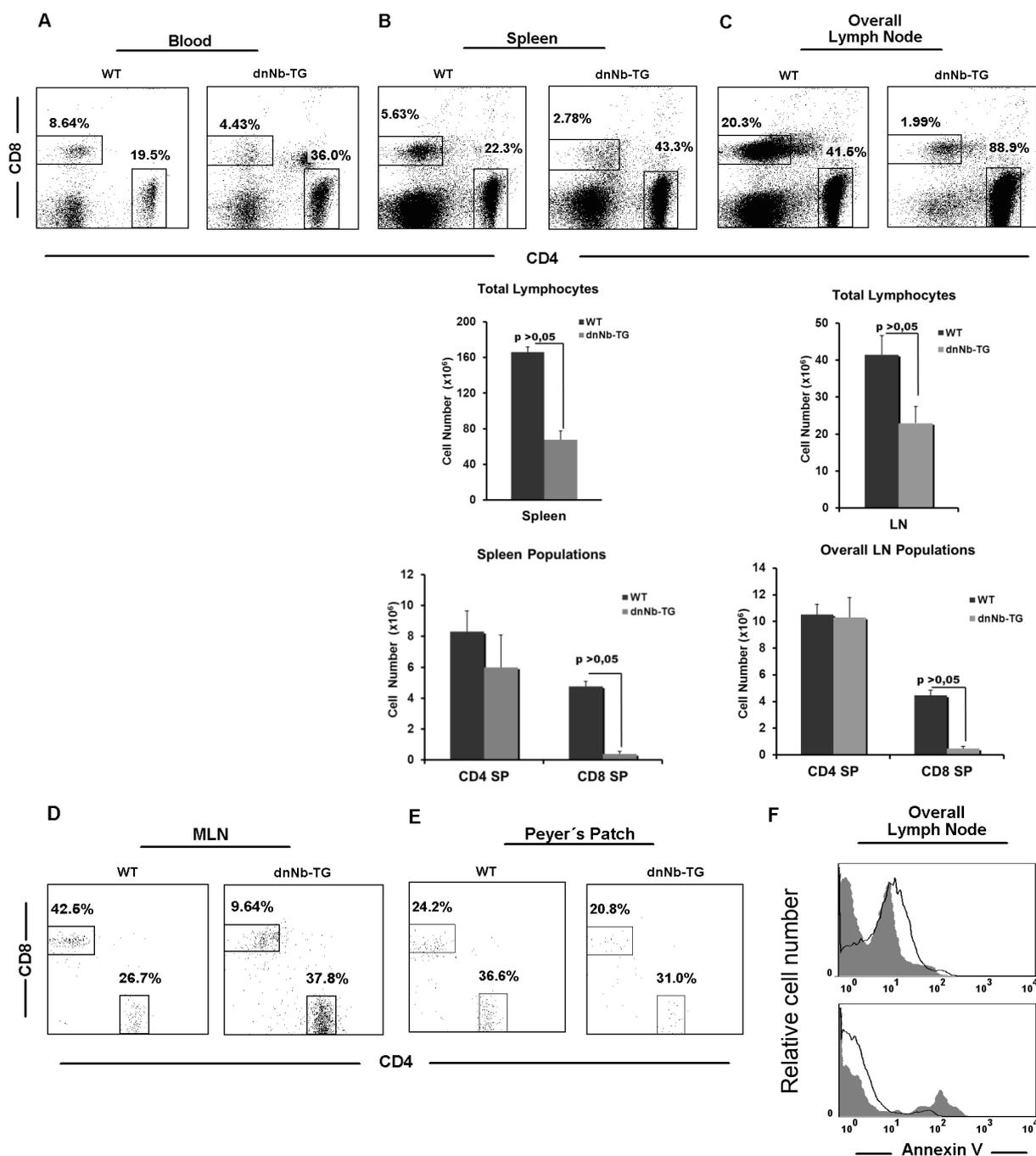


Figura. 5 La inhibición de Numb endógeno condiciona la distribución de linfocitos en órganos periféricos: A-C. Representación de porcentajes por citometría de flujo y números absolutos de linfocitos CD4 y CD8 en la periferia. WT (barra negra) versus TG-dnNb (barra gris). D-E. Linfocitos T alojados en los nódulos mesentéricos (MLN) y placas de Peyer's (PP) F. Niveles superficiales de Anexina V en las células alojadas en los ganglios de nódulos linfáticos. WT (línea continua) versus TG-dnNb (línea entrecortada y sombreado).

Resultados

Al observar la limitación que presentaban estas células en su migración hacia la periferia, quisimos indagar si dentro del reducido grupo que lograba poblar los SLO's existía alguna otra alteración, intentando así descifrar el efecto inducido por el dnNb. Las células al salir del timo tienen un fenotipo de células vírgenes, y es esta población la que migra a la periferia. Para tener una idea del tipo de células alojada en los nódulos mesentéricos (MLN) y en el bazo, estudiamos los fenotipo de células vírgenes respecto a células de memoria en ambas poblaciones. Realizamos una inmunodetección contra los receptor CD4, CD8, TCR y CD45Rb. Las células con un nivel superficial CD45Rb^{high} se consideran vírgenes, una vez las células son activadas disminuyen sus niveles superficiales (CD45Rb^{low}) y pasan a ser células de memoria.

Al confrontar los porcentajes, encontramos que en los ratones WT existe un 34% de linfocitos T CD8 con fenotipo de células vírgenes CD8-CD45Rb^{high}, mientras que en ratones TG-dnNb el porcentaje era de 4.36% CD8-CD45Rb^{high}, por lo cual la población T CD8 en estos ratones presenta un fenotipo de memoria (Fig. 6-A, Izquierda). De igual forma se pudo encontrar este patrón en las células alojadas en el bazo, con un 30.5% WT versus 12.3% TG-dnNb en células CD8-CD45Rb^{high} (Fig. 6-A, Derecha). De todos modos, este resultado podría ser un efecto de la proliferación homeostática como resultado de una deficiencia de linfocitos T CD8 en la periferia.

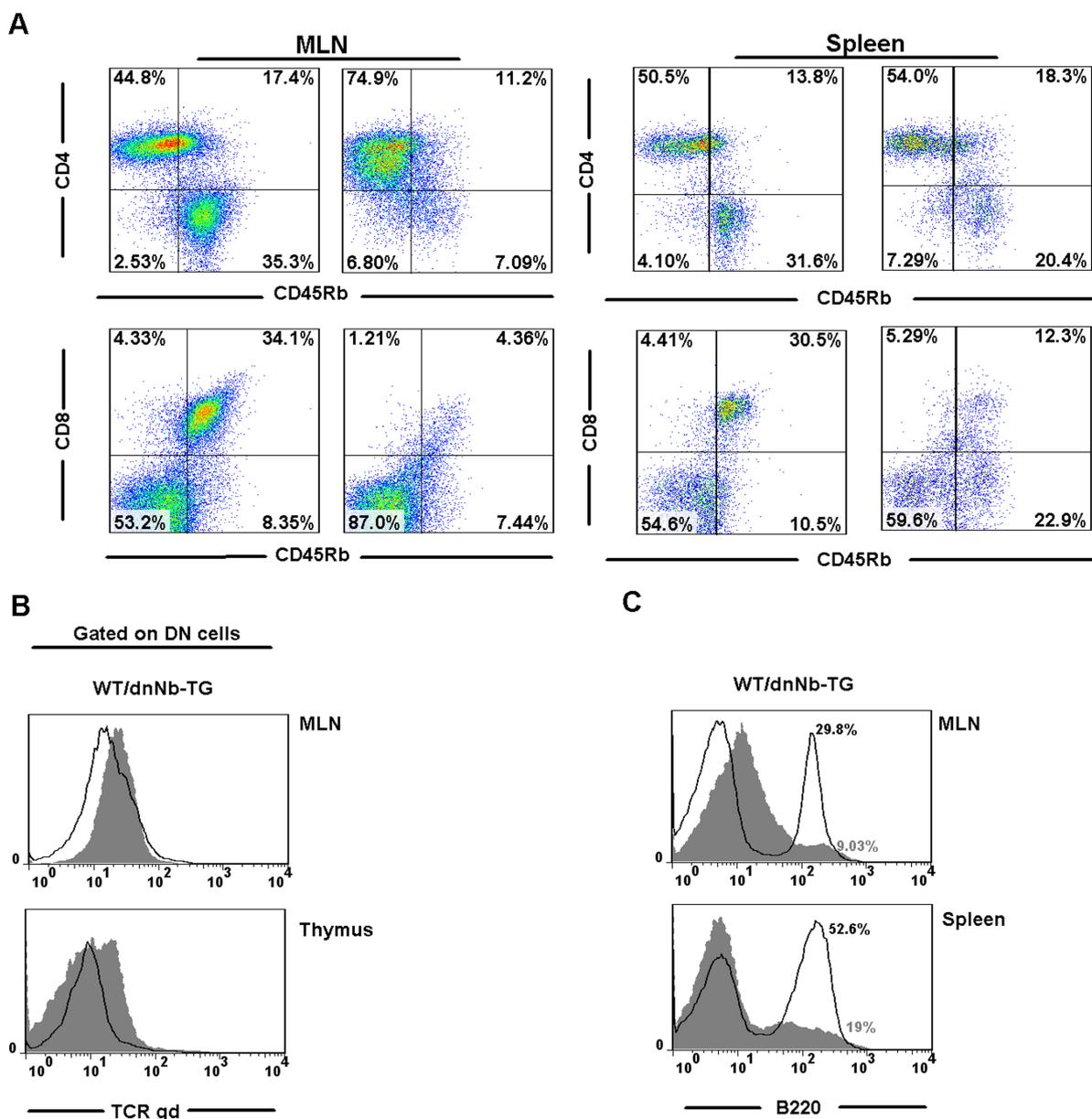


Figura. 6 El dominante negativo induce un fenotipo de células de memoria en los linfocitos CD8 periféricos y modifica el porcentaje de otros tipos celulares: **A.** Fenotipo celular por citometría de flujo para linfocitos en los nódulos mesentéricos y del bazo. CD4 o CD8 frente al marcador CD45Rb respectivamente. Células CD45Rb^{low} presentan fenotipo de memoria. **B.** Niveles superficiales de TCR $\gamma\delta$ en linfocitos (top) y timocitos (bottom) totales **C.** Niveles superficiales del receptor B220 en linfocitos (top) y timocitos (bottom) totales. Ratones WT (línea continua) versus TG-dnNb (línea entrecortada y sombreada).

Resultados

Una vez identificado el tipo celular alojado en la periferia en los ratones Tg-dnNb, quisimos averiguar si el patrón de disminución en la periferia de los linfocitos CD8-dnNb ocurría en otros grupos celulares de células T. En efecto, al realizar inmunodetección las células con receptor TCR $\gamma\delta$ en ratones TG-dnNb, pudimos observar un leve aumento del porcentaje de células TCR $\gamma\delta^+$ en los nódulos mesentéricos (MLN) frente al WT (Fig.6-B). Curiosamente, al verificar esta misma población en el timo, observamos un patrón similar. Ello puede sugerir alguna relación entre Numb y la población TCR $\gamma\delta^+$.

Como resultado de la prueba anterior, quisimos indagar y verificar si el dnNb era capaz de producir algún efecto fuera de las células T. Para estudiar esta posibilidad utilizamos el marcador B220 (Células B) como diana. Para nuestra sorpresa identificamos que los ratones TG-dnNb presentan una diferencia notable en los porcentajes para la población con el receptor B220, tanto en los nódulos MLN como en el bazo (Fig.6-C). Un fenómeno esperable, si se toma en consideración que las células B expresan, al igual que las células T, el promotor CD2, necesario para la expresión del dominante negativo. Sin embargo, un estudio más exhaustivo sería necesario para determinar el grado de implicación (si alguno) que tiene Numb en el desarrollo de las células B y los posibles efectos del dominante negativo.

4.3 DnNb induce una acumulación específica de timocitos CD8SP en el timo

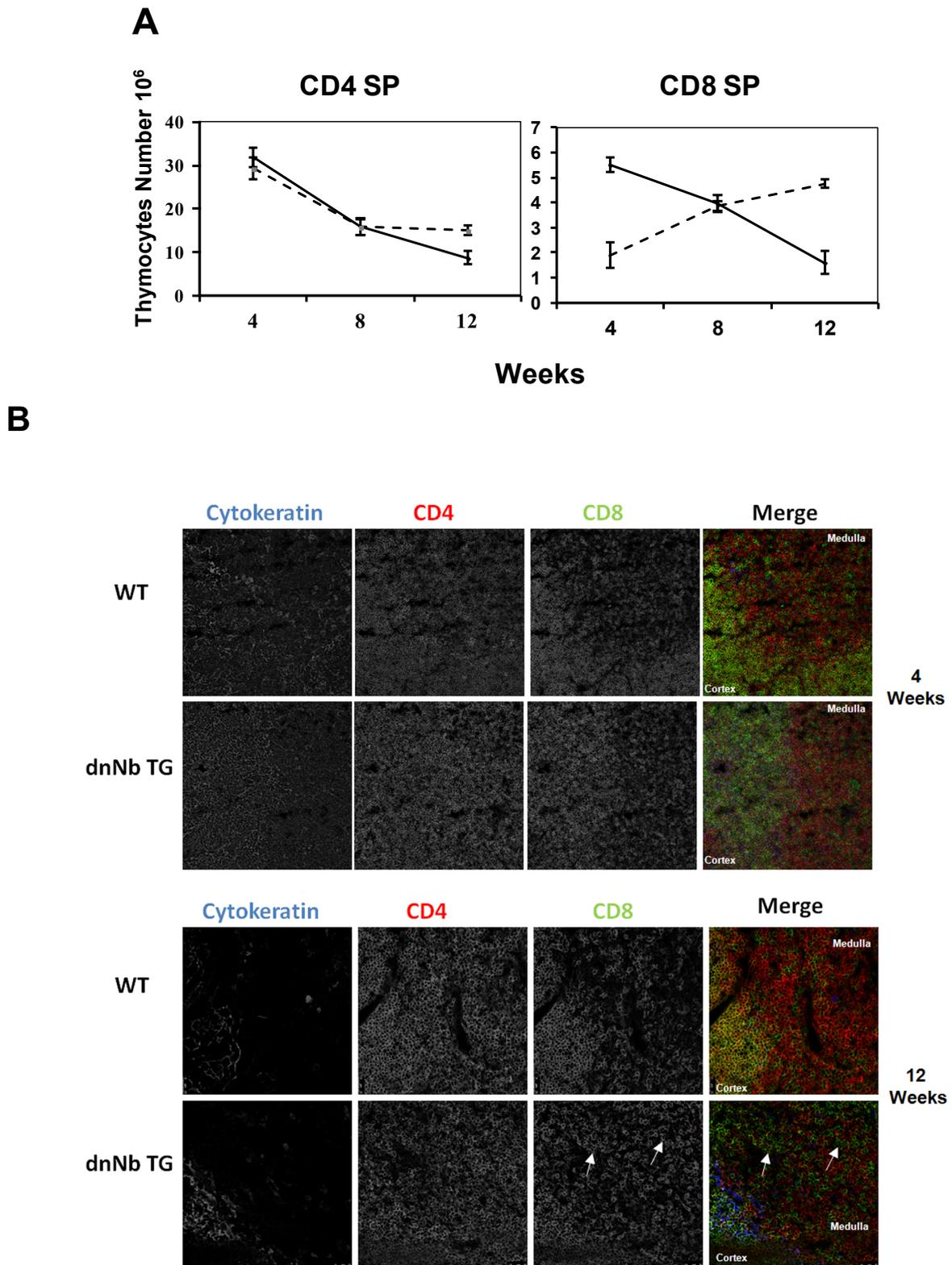
Al considerar que la apoptosis en los nódulos linfáticos no es suficiente como para explicar por sí sola la disminución de linfocitos T CD8-dnNb en la periferia, y dado que los timocitos son los precursores de los linfocitos, razonamos que debíamos volver nuevamente al efecto del dnNb dentro del timo. Nuestra hipótesis para la disminución en la periferia de los ratones TG-dnNb era una posible retención dentro del timo, o dificultad a la hora de salir. Para indagar estas

posibilidades, nuestro primer enfoque fue calcular los números absolutos de las subpoblaciones de timocitos simples positivos a diferentes edades. Como resultado de este estudio, identificamos un aumento con la edad de los números absolutos de los timocitos CD8SP-dnNb respecto al WT (Fig.7-A). Este aumento se detectaba ya a las 8 semanas de edad, manteniéndose hasta las 12 semanas de observación.

El patrón de acumulación observado fue nuevamente exclusivo para la población CD8SP, ya que en ambos ratones la población CD4SP presentaba la reducción característica para cada edad estudiada. Es decir, a mayor edad del ratón, menor número de células en el timo, un fenómeno típico durante la involución del timo y resultado distintivo de la migración de los timocitos. El menor número inicial que presentan las CD8SP-dnNb respecto a las WT en las cuatro semanas de edad, se podría explicar por los bajos niveles de proliferación de estas células (ver Fig.2-A).

Con el propósito de tratar de localizar el aumento encontrado en los números absolutos de las CD8SP-dnNb, realizamos un estudio por microscopia confocal de su distribución en el timo. En este estudio se utilizaron tejidos de timo congelado de ratones con 4 y 12 semanas de edad. Al realizar la comparación de las imágenes obtenidas en el microscopio, encontramos que los ratones TG-dnNb presentaban una acumulación específica para la población CD8SP-dnNb en la zona/compartimiento de la médula (Fig.7-B), la última zona del timo donde se alojan las células antes de migrar. Esta retención observada en el timo podría ser la razón principal, o de mayor peso, para la disminución celular observada en la periferia, reforzando la idea de un efecto predominante de dnNb en el timo.

Resultados



■ **Figura. 7 Acumulación específica de CD8SP-dnNb en el timo:** **A.** Representación de los números totales para CD4SP y CD8SP en el timo a diferentes edades, WT (línea continua) versus TG-dnNb (línea entrecortada) **B.** Análisis por microscopía confocal en secciones de timo congeladas a 4 y 12 semanas de edad. Las flechas indican el secuestro específico para CD8SP-dnNb TG en la médula.

4.4 Implicación de Numb durante el proceso de la adhesión celular en timocitos

Este secuestro identificado en el timo podría ser explicado por dos razones: (i) una alteración de la adhesión celular, (ii) una migración interrumpida y/o desviada por la inhibición de Numb. Los datos presentados hasta el momento, nos hacen pensar que Numb tiene una participación en la adhesión y/o migración en los timocitos.

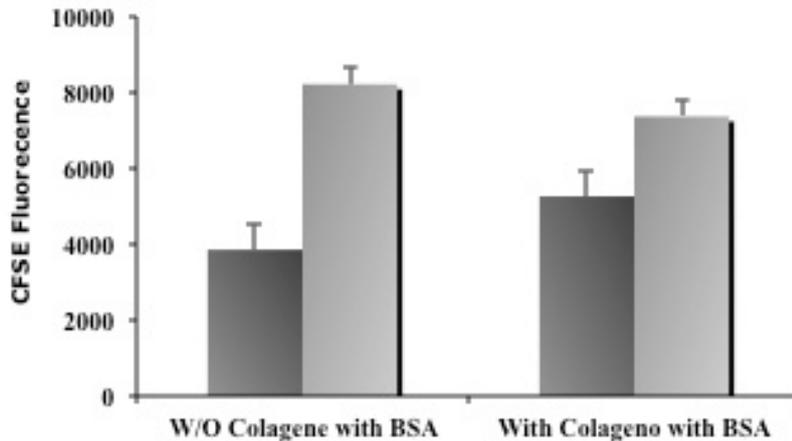
4.4.1 La adhesión celular de los Timocitos Totales a Colágeno, proteína de la Matriz Extracelular del timo

Uno de los mecanismos que podría estar afectado por el dnNb es la interacción de los timocitos con las proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno y la fibronectina, entre otras. Estas interacciones forman parte del desarrollo intratímico, por tal razón nos enfocamos en examinar el efecto de dnNb en esta función.

Para esta prueba, teñimos los timocitos totales con CSFE en una placa de 48 pocillos tratada previamente con colágeno y se incubaron a 37°C en presencia de 5% CO₂. Después de comparar los valores de fluorescencia entre los pocillos control (no tratados con colágeno) y los tratados, se observó un aumento de timocitos totales del ratón WT en presencia de colágeno, con respecto a su ausencia (Fig.8). Sin embargo, la diferencia es menor en ratón TG-dnNb.

La conclusión de este experimento es que los timocitos del ratón TG-dnNb presentan un aumento en la capacidad de adhesión a la placa en comparación con los timocitos WT, pero esta es independiente de colágeno.

Resultados



■ **Figura. 8 Representación in vitro de la adhesión celular de timocitos a la matriz extracelular:** La inhibición de Numb no induce un aumento en la adhesión de timocitos totales para pocillos tratados con Colágeno. Pocillos control izquierda, pocillos tratadas derecha. Ratones WT (barra negra) versus TG-dnNb (barra gris).

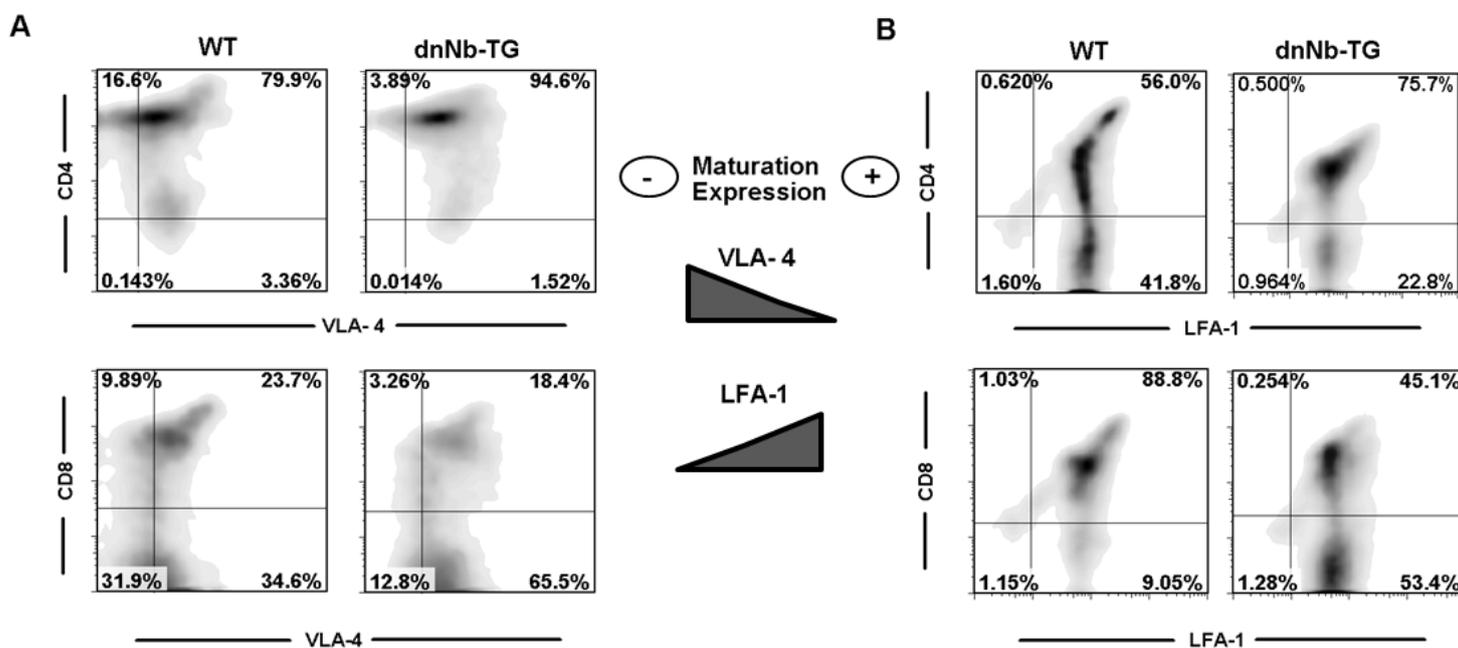
4.4.2 *Numb* y la expresión de moléculas de adhesión a la Matriz Extracelular: “Lymphocyte function-associated antigen-1” (LFA-1) y “Very Late Antigen-4” (VLA-4)

Además de la interacción que poseen los timocitos con el colágeno, existen otras proteínas y/o receptores capaces de mediar la unión a la matriz extracelular (ECM). La interacción con las células estromales del timo (thymic stromal cells-TEC) es importante para un desarrollo correcto de los timocitos. Siguiendo esta línea de pensamiento estudiamos la proteína que modula esta interacción, que a su vez es responsable también del reconocimiento de la Fibronectina; la molécula de adhesión VLA-4, que pertenece a la familia de las integrinas. Al comparar los niveles de expresión medidos por citometría de flujo, observamos que el dnNb induce una sobreexpresión superficial en los timocitos TCR^{high} CD4SP y CD8SP de VLA-4 (Fig.9-A).

Otra de las proteínas expresadas por los timocitos y que interviene en la adhesión dentro del timo es LFA-1, específicamente en la interacción con las células epiteliales del timo (TEC). Además, es importante en el reconocimiento por parte de

los linfocitos y las células presentadoras de antígeno (APC). Una vez más, utilizando citometría de flujo verificamos los niveles superficiales en los timocitos. A diferencia de VLA-4, encontramos que los timocitos TCR^{high}CD8-dnNb presentan una disminución de LFA-1 al confrontarlos con los WT [88.8% WT vs 45.1% TG], cuando normalmente aumentan sus niveles en la fase simple positiva (Fig.9-B). Por otro lado, los timocitos TCR^{high}CD4-dnNb exhiben un aumento de los niveles superficiales de LFA-1 comparado con los WT.

El aumento de expresión superficial de VLA-4 podría estar aumentando la capacidad de adhesión de los timocitos, contribuyendo a su retención en el timo. De igual forma, se pudo observar que los ratones TG-dnNb expresan más LFA-1 en los linfocitos alojados en los nódulos (dato no presentado). Esta sobreexpresión también podría alterar la relación entre las células T y las APC.

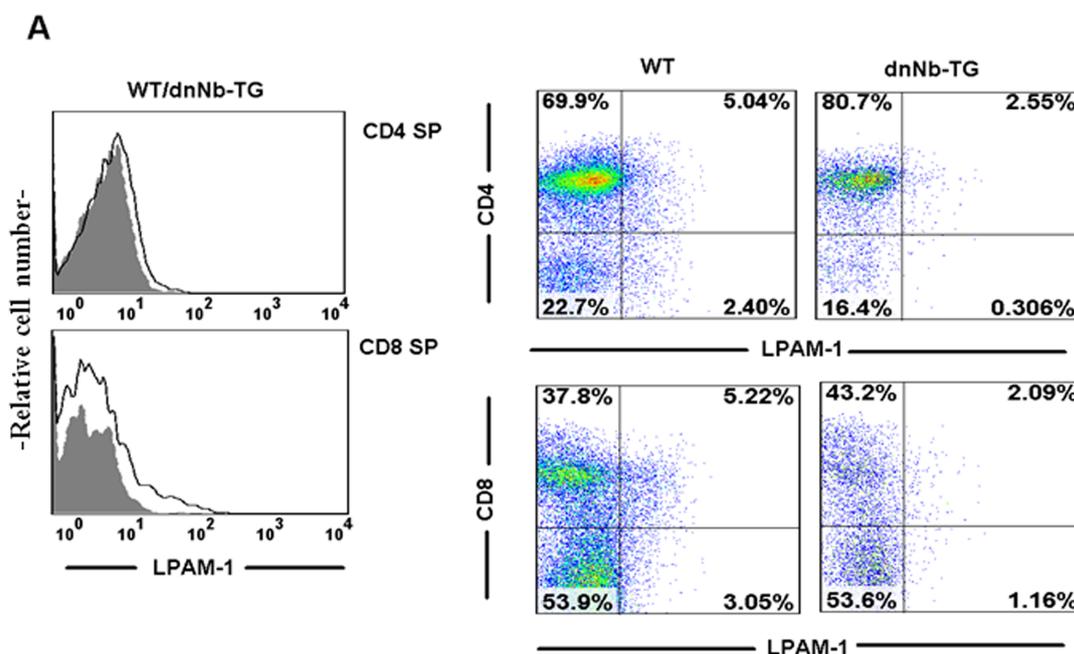


■ **Figura.9 Representación por graficas de densidad para los niveles de las moléculas de adhesión en las subpoblaciones CD4SP y CD8SP.** A. Expresión superficial de VLA-4 en CD4SP y CD8SP del timo B. Expresión Superficial para LFA-1 en CD4SP y CD8SP del timo. Diagrama intermedio presenta patrón de expresión para ambas moléculas según la maduración.

4.4.3 *El dominante negativo para Numb induce una disminución en la integrinas $\alpha 4\beta 7$ (LPAM-1) y una sobreexpresión en $\alpha E\beta 7$ (CD103)*

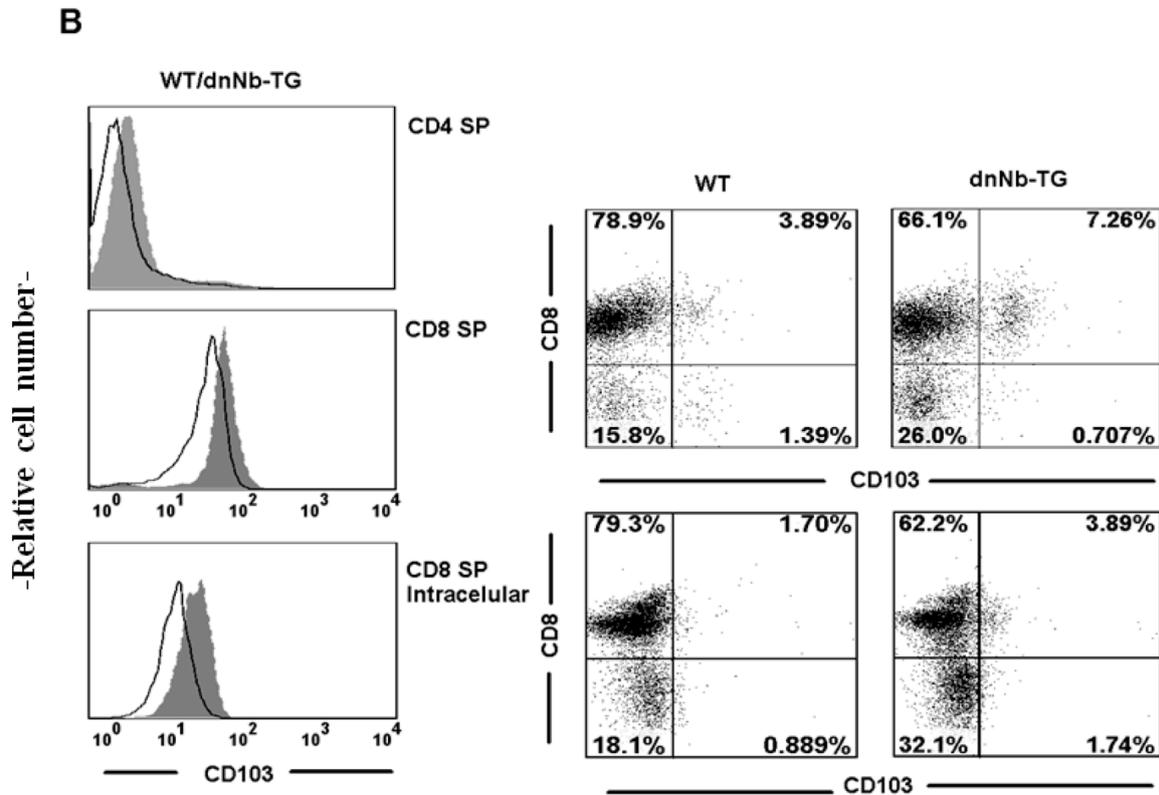
Se conoce la interacción específica que existe entre Numb y ciertas integrinas que son moléculas de adhesión por excelencia. Tomando en cuenta que nuestros timocitos totales no presentan un aumento en la adhesión a la ECM (colágeno) y que las CD8SP-dnNb son las únicas en mostrar un efecto inducido por el dominante negativo, indagamos la existencia de moléculas de adhesión específicas para esta población. De esta forma pudimos encontrar que la población RTE CD8SP, es positiva para la cadena $\beta 7$ de integrinas, cadena que puede formar dos tipos de integrinas, la $\alpha 4\beta 7$ y la $\alpha E\beta 7$ cada una con sus funciones pero una en común, la localización de los linfocitos en el intestino.

Para estudiar los niveles de expresión de estas integrinas y determinar si dnNb provoca alguna modificación en sus niveles de expresión empezamos con la integrina $\alpha 4\beta 7$ (mejor conocida como LPAM-1). La integrina LPAM-1, se caracteriza por mediar la migración de los linfocitos precursores intraepiteliales (IEL) del intestino. Los precursores de estas células se desarrollan en el timo y la población IEL está formada en un 90% por linfocitos CD8. Al examinar la inmunodetección superficial en los timocitos simples positivos en el timo, encontramos que tanto los CD4SP como los CD8SP del ratón TG-dnNb presentan una disminución del 50% en la expresión para LPAM-1 (Fig.10-A). Quisimos verificar si los linfocitos que logran entrar a los nódulos linfáticos expresaban el mismo patrón. Como era de esperar, este comportamiento no fue detectado en los nódulos (datos no presentados), ya que LPAM-1 no está vinculada a este tipo de migración, sino más bien está relacionada con el acceso a los intestinos.



■ **Figura. 10: Expresión superficial de la integrina $\alpha 4\beta 7$ en timo:**
 A. Representación por graficas de Histograma y Dot Plot para la expresión en timocitos CD4 y CD8 simples positivos. WT (línea continua) versus TG-dnNb (línea entrecortada y sombreada). Dot Plot superiores tinción superficial, inferiores intracelular.

A diferencia de LPAM-1, la integrina $\alpha E\beta 7$ (mejor conocida como CD103) tiene una expresión específicamente restringida a las células CD8 y participa tanto en la adhesión celular como en la migración. Al investigar sus niveles superficiales en los timocitos CD8SP-dnNb encontramos que la expresión de dnNb no induce la expresión de esta integrina en timocitos CD4SP, pero si induce una sobreexpresión superficial en timocitos CD8SP-dnNb comparado con WT (Fig.10-B). Al tener una expresión restringida a las CD8, nos preguntamos si la expresión intracelular también presentaba alguna modificación. Curiosamente, al analizar sus niveles pudimos observar que mantenía el mismo patrón de sobreexpresión (Fig.10-B, Panel inferior). En ambos casos dnNb induce prácticamente el doble de expresión de CD103 con respecto al WT. Estos resultados nos sugieren que su mecanismo de degradación o reciclaje podría estar alterado.

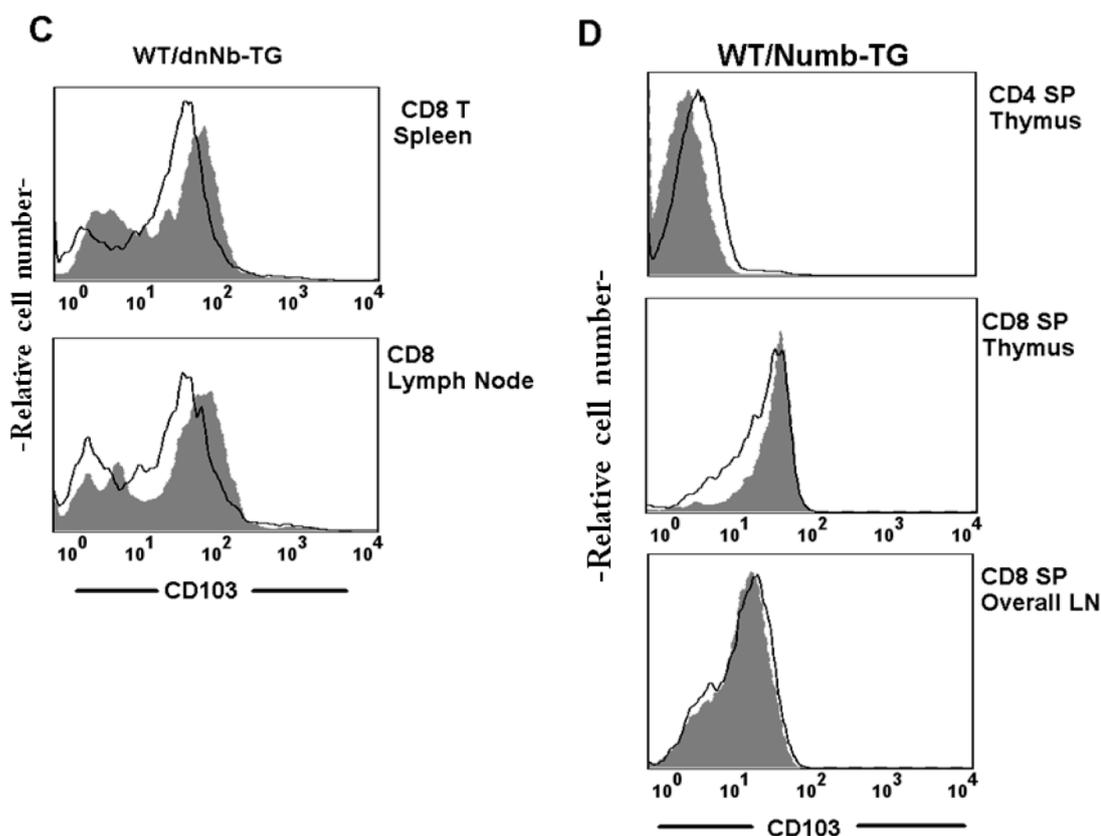


■ **Figura. 10-B Expresión de la integrina $\alpha E\beta 7$:** Representación por graficas de Histograma y Dot Plot para la expresión en timocitos CD8 simples positivos. Panel intermedio tinción superficial, panel inferior tinción intracelular. WT (línea continua) respecto a TG-dnNb (línea entrecortada y sombreada). Dot Plot superiores: tinción superficial, inferiores: intracelular.

La integrina CD103 tiene una interacción exclusiva con la caderina E (Ecad), expresada por las células epiteliales del timo. La sobreexpresión de CD103 podría ser específica solamente para el timo, realizando el mecanismo de regulación correcto una vez fuera del mismo. Para esclarecer esta incógnita y estudiar su comportamiento en los linfocitos periféricos, procedimos a verificar los niveles superficiales de CD103 en los linfocitos de los órganos secundarios. Al confrontar los niveles en linfocitos TG-dnNb con los de WT encontramos que se mantenía la sobreexpresión reflejada en el timo (Fig.10-C). Por tanto, la sobreexpresión

detectada podría estar llevando a un aumento en la adhesión celular de las CD8SP-dnNb a Ecad, expresada en las células epiteliales (TEC) del timo.

Todo este patrón en los niveles de CD103 es el resultado de la inhibición de Numb, por lo que presumimos que una sobreexpresión en la expresión de Numb (ratones TG-Numb) no provocaría el fenotipo observado en TG-dnNb. En efecto, y acorde a nuestra hipótesis los linfocitos CD8 de ratones TG-Numb presentaron unos niveles de expresión totalmente paralelos a los ratones WT, tanto en el timo como en los nódulos linfáticos (Fig.10-D).



■ **Figura. 10 C-D: Expresión superficial de la integrina $\alpha E\beta 7$ en periferia:** C. Expresión superficial en linfocitos del bazo (panel superior) y nódulos en general (panel inferior) D. Fenotipo de ratones Numb-TG para la integrina $\alpha E\beta 7$: Expresión superficial en timocitos CD4SP (panel superiores), timocitos CD8SP (intermedio) y linfocitos CD8 de nódulos linfáticos (panel inferior). Ratones WT (línea continua) versus Numb-TG (línea entrecortada y sombreada).

Resultados

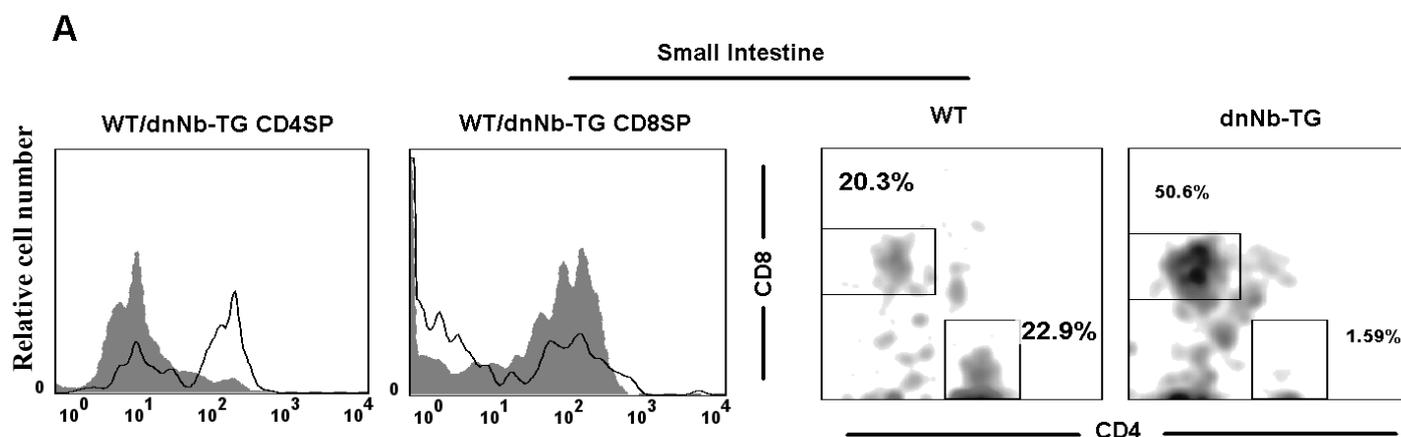
Ya que una de las funciones de CD103 está relacionado con la migración de los linfocitos intraepiteliales (IEL) al intestino y debido a la ausencia de estos en los nódulos linfáticos en ratones TG-dnNb, quisimos evaluar la hipótesis de una posible migración al intestino como consecuencia de CD103. De existir un aumento, debería ser específico para la población CD8SP-dnNb. Para esto, llevamos a cabo un proceso de aislamiento de los linfocitos alojados en el intestino delgado y grueso, realizando una tinción superficial utilizando los marcadores CD4 y CD8 $\alpha\beta^+$ en linfocitos a su vez TCR $\alpha\beta^+$, excluyendo los CD8 $\alpha\alpha^+$ /TCR $\alpha\beta^+$ y linfocitos con receptor TCR $\gamma\delta^+$.

Al comparar los porcentajes de los linfocitos T CD8-IEL en el intestino delgado, observamos que los ratones TG-dnNb presentan un porcentaje significativamente mayor (casi 2.5 veces más) en comparación con el WT (Fig.11-A). Al mismo tiempo, se observó que el patrón de sobreexpresión de CD103 se conservaba en los linfocitos dnNB-CD8 IEL (dato no presentado). Al calcular los números absolutos de los linfocitos CD103⁺, se mantuvo el aumento de sobreexpresión. Sin embargo, este aumento de linfocitos dnNB-CD8 IEL no se observó en el intestino grueso, presentando porcentajes semejantes a los ratones WT (Fig.11-B). Ello nos sugiere que la sobreexpresión de CD103 puede inducir un aumento de la migración hacia el intestino delgado por parte de los linfocitos CD8-dnNb, alterando su preferencia al salir del timo. Interpretamos que a pesar del aumento de dnNB-CD8 IEL en el intestino delgado, ello no afecta la capacidad de migrar hacia el compartimiento del intestino grueso.

Por otra parte, el porcentaje de linfocitos dnNb-CD4 IEL presentó una disminución considerable en el intestino delgado (Fig.11-A, Dot Plot). Los linfocitos CD4 pueden expresar CD103 una vez dentro del intestino, lo cual nos llevo a verificar sus niveles superficiales, pero no se identificó diferencia en los niveles superficiales. Desconocemos las posibles razones para que esta población

pueda presentar estos porcentajes, ya que para el intestino grueso la población se mantuvo con unos porcentajes semejantes (dato no presentado).

Con estos resultados demostramos que la inhibición de Numb induce una modificación en el mecanismo de migración de los linfocitos CD8SP-dnNb al salir del timo. Esta modificación podría alterar el funcionamiento del sistema inmunitario, especialmente en lo que concierne a la función de citotoxicidad de las células CD8. Estudios mas detallados serian necesarios para analizar su capacidad de orquestar respuestas inmunes o completar otras funciones.



■ **Figura. 11: Acumulación de linfocitos IEL CD8 en ratones TG-dnNb:** Fenotipo de ratones TG-dnNb para la población intraepitelial en el intestino delgado. Histograma (parte izquierda) y gráficas por densidad (parte derecha). Ratones WT (línea continua) versus TG -dnNb (línea entrecortada y sombreada).

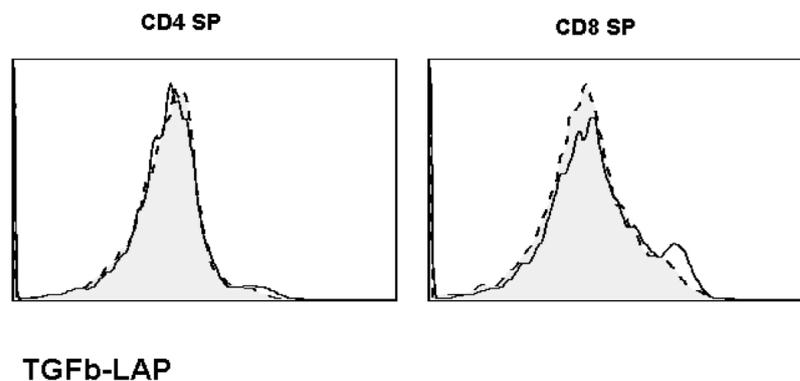
Resultados

4.5 Modulación de la Integrina CD103 por el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β)

4.5.1 El Factor de crecimiento TGF- β_1 no induce la sobreexpresión de CD103 en la inhibición de Numb endógena

La sobreexpresión encontrada para la integrina CD103 en los ratones TG-dnNb se podría interpretar como: (i) un efecto de la interacción directa de nuestro dominante negativo o (ii) un efecto en forma indirecta al resultar alterado(s) otra(s) proteína/complejo. Para intentar aclarar el mecanismo de su efecto sobre CD103, indagamos el comportamiento de otras proteínas que modulen su expresión. Encontramos que el factor de transcripción TGF- β posee la capacidad de regular la expresión de CD103, convirtiéndose en un perfecto candidato a estudiar.

Utilizando un anticuerpo que reconociera la isoforma LAP (*Latency Associated Peptide*), marcamos superficialmente el complejo pre-TGF β (LAT) o latente de TGF- β (*small latent TGF β complex*). Este complejo es el precursor de la isoforma TGF- β activada. Al analizar los resultados obtenidos por citometría de flujo y comparar los niveles superficiales, observamos que ninguna de las subpoblaciones de timocitos maduros presentaban alteración superficial en los ratones TG-dnNb, comparado con el WT (Fig. 12). Ello nos sugiere que la inhibición de Numb no afecta los niveles superficiales de TGF- β (LAT), por lo cual deducimos que la sobreexpresión de CD103 no estaría provocada por un efecto de TGF- β .



■ **Figura. 12 Niveles superficiales de TGF- β no son afectados por la expresión del dnNb:** Expresión del precursor para TGF- β en las subpoblaciones de timocitos simples positivos. WT (línea continua) versus TG-dnNb (línea entrecortada).

Discusión

5 Discusión

Comprender los mecanismos de funcionamiento del Sistema Inmunitario ha sido siempre uno de los principales objetivos de la investigación molecular en las últimas décadas, gracias a los avances en la tecnología, se han superando diferentes limitaciones técnicas en el campo de la Inmunología. Sin embargo, existen áreas que aun no han sido estudiadas ni descritas en su totalidad. Para lograr entender como funciona el Sistema Inmunitario es primordial conocer cómo se desarrollan y funcionan las células T y B. Uno de los mecanismos que permite un desarrollo celular óptimo de estas células es la internalización y degradación de los receptores superficiales. La proteína adaptadora Numb participa en ambos procesos celulares y es expresada por las células T, convirtiéndola en un candidato perfecto a estudiar.

La proteína Numb fue descrita por primera vez dentro del sistema nervioso de *Drosophila* como un modular negativo de Notch, y como un determinante intrínseco (*cell-fate determinants*) en la toma de decisiones por parte de los progenitores de órganos sensoriales (SOPs en ingles) en el sistema nervioso. Posteriormente se describió su homólogo en mamíferos (mNumb) y su expresión en células inmunitarias, lo que inició su estudio para determinar su función dentro del Sistema Inmunitario. Uno de los inconvenientes iniciales para estudiar sus funciones fue que ratones deficientes (*Knock-out*) para Numb mueren prematuramente durante su desarrollo. Otro aspecto a tener en cuenta es la cantidad intima que se necesita de Numb en la célula para que este cumpla plenamente su función, lo cual a sido demostrado por el grupo del Dr. Weimin Zhong. Los estudios iniciales de E. Robey, y colaboradores, utilizando la técnica de delección condicional no alcanzaron su propósito en su totalidad, ya que los ratones presentaban un fenotipo semejante a ratones WT. Sus conclusiones fueron que la delección condicional Numb inhibía su función, pero su homólogo Numb-like podría compensar su ausencia.

Esto motivó al laboratorio de Anne Wilson a realizar delección doble para Numb y Numb-like, en cuyos resultados se observa un leve secuestro en la fase doble negativo 3 (DN3) del desarrollo en timocitos. Sin embargo, esta técnica no fue plenamente exitosa debido a la incompleta delección de Numb.

Para superar los problemas técnicos anteriormente mencionados, en este trabajo hemos utilizado ratones que expresan un número muy alto de copias de un dominante negativo para Numb (TG-dnNb) bajo el promotor CD2. Este promotor es específico para las células T y B, expresándose en todas sus fases de desarrollo, lo que nos asegura su expresión continua. Utilizamos una segunda línea transgénica, sobreexpresando Numb (TG-Numb). Por tanto, los ratones TG-dnNb mostrarían una disminución en los niveles funcionales de Numb endógena y los ratones TG-Numb un aumento en la cantidad de Numb funcional.

Se han realizados diferentes estudios sobre Numb y el Sistema Inmunitario, sin embargo se conoce muy poco sobre su participación dentro del mismo. Anteriormente, nuestro laboratorio ha demostrado por primera vez que los timocitos realizan una división asimétrica durante su desarrollo, siendo Numb un determinante en el destino celular (proliferación versus diferenciación), determinando la celularidad total del timo. Además, hemos identificado un modelo nuevo en la regulación del receptor TCR, específicamente en su mecanismo de degradación, donde Numb modula la interacción entre la ligasa de ubiquitinación Cbl y el complejo TCR.

Gracias a los avances en las técnicas de investigación y el desarrollo de diferentes inmunosupresores, se ha podido explicar mejor el complejo proceso de migración celular en ratones adultos. Existen múltiples receptores, moléculas y complejos proteicos que juegan un papel importante, controlando la salida celular del timo. Sin embargo, aun no se tiene una idea clara de cómo es regulado este complejo proceso. La migración de los linfocitos T es primordial para el

Discusión

funcionamiento idóneo del Sistema Inmunitario, su presencia en los órganos linfáticos secundarios periféricos (pSLOs), como son los nódulos linfáticos (LN), es clave para activar la respuesta inmune. La interacción de linfocitos y células presentadoras de antígeno (APC) ocurre en estos ganglios, por lo cual, una presencia de estas células en la periferia es obligatoria. Sin embargo, nuestros ratones TG-dnNb presentan una disminución significativa de la población CD8 en bazo, nódulos e incluso en la sangre. Esta disminución en la sangre significa que los linfocitos CD8 no circulan plenamente en el torrente sanguíneo, una de las vías utilizadas por los timocitos (precursores de linfocitos) para salir del timo. Esta disminución periférica podría representar una capacidad menor en los ratones TG-dnNb en su actividad citotóxica, utilizada para la eliminación de antígenos, sin embargo los ratones son perfectamente viables.

Según esto, es probable que la salida de los linfocitos T CD8 maduro esté regulada por la actividad de Numb endógena. El modelo de migración aceptado para los timocitos actualmente se conoce como “*Conveyor Belt*”, y establece que los timocitos necesitan alcanzar un fenotipo maduro para poder salir a la periferia. Esto significa que cualquier alteración durante su desarrollo evitaría un avance a la siguiente fase de desarrollo en el timo, activando el mecanismo de apoptosis para su muerte celular y/o impidiendo su salida del timo. La salida del timo se produce desde su zona medular, donde se tiene establecido que los timocitos SP maduros pasan alrededor de 14 días antes de recibir las señales necesarias para su salida. Actualmente, se toman en consideración los niveles superficiales de un conjunto de receptores para catalogar las células como semi-maduras o maduras.

Debido a que la inhibición de Numb reduce los números periféricos de linfocitos CD8, quisimos comprobar la implicación de Numb en la expresión de estos receptores. De esta manera, comprobamos que la subpoblación CD4SP presenta un fenotipo de células maduras (CD69^{low}, CD62L^{high}, HSA^{low}, Qa-2^{high}) en ambos ratones, mientras la subpoblación CD8SP solo es madura en ratones WT,

identificando un fenotipo “*híbrido*” en los ratones TG-dnNb. Los timocitos CD8SP-dnNb tienen características superficiales de ambas fases, con alteraciones de la expresión de CD69 y CD62L, resultando un fenotipo combinado final de CD69^{high}, CD62L^{low}, HSA^{low}, Qa-2^{high}. Según el modelo de migración “*Conveyor Belt*”, este fenotipo “*híbrido*” presentado por nuestra subpoblación CD8SP-dnNb le estaría obstaculizando la salida normal desde el timo.

La incapacidad para aumentar la expresión de CD62L podría tener un efecto doble, ya que este receptor ejerce como molécula de adhesión por excelencia en los “*High Endothelial Venules*”, la vía de entrada a los nódulos linfáticos para los linfocitos. Por lo tanto, se puede deducir que además de comprometer la salida del timo, la inhibición de Numb estaría limitando la entrada a los LN, alteraciones que explicarían la disminución periférica. De igual forma, el efecto de sobreexpresión sobre CD69 podría ser doble. Además del conjunto de receptores anteriormente mencionados para la maduración, los timocitos deben ser positivos para la expresión del receptor S1P₁, receptor antagonista de CD69. Este receptor ejerce una actividad quimiotáctica en los timocitos, respondiendo a los niveles de su ligando S1P en la sangre. De este modo, induce la migración fuera del timo para los timocitos, lo que significa que nuestro dominante negativo para Numb podría estar bloqueando indirectamente la expresión de S1P₁ como resultado de la sobreexpresión por CD69. Sin duda alguna, una inhibición superficial de S1P₁ aumentaría la dificultad en la migración de nuestros timocitos CD8SP-dnNb e induciría una acumulación de esta población en el timo.

Para comprobar nuestra hipótesis, estudiamos la capacidad de regulación de los niveles superficiales de CD69 en nuestros timocitos CD8SP-dnNb y analizamos los niveles de ARNm de S1P₁. Mediante estos experimentos, pudimos demostrar que el dominante negativo de Numb no posee la capacidad de interferir en ninguno de los dos aspectos, observando una regulación superficial (disminución) de CD69 en los timocitos CD8SP-dnNb apta para permitir la expresión superficial de S1P₁ según sus

Discusión

valores de ARNm. Del mismo modo, interpretamos que, al no observar una diferencia significativa en los niveles de ARNm de S1P₁ y detectar una presencia de CD4 en la periferia (dependientes de S1P₁) su actividad quimiotáctica en los timocitos es correcta. De todas formas, no se descarta la posibilidad de algún efecto en la S1P₄ que también es expresado por las células T, estudios más específicos serían necesarios para aclarar este punto.

Un aumento o disminución de los linfocitos en la periferia sugiere algún problema con sus precursores directos, como se ha explicado anteriormente. El patrón de migración de los linfocitos empieza con la salida a los órganos secundarios (ganglios linfáticos, bazo), donde suelen ser activados por las células APC, y luego realizan usualmente una migración a tejidos inflamados, los cuales son denominados por algunos como órganos terciarios, habiendo cierta polémica con esta denominación. Nuestro fenotipo “*híbrido*” presentado por la subpoblación CD8SP-dnNb, nos indica que el efecto del dominante negativo actúa dentro del timo, de igual forma sugiere una retención de estas células. Mediante microscopia confocal, y estudiando los números absolutos a diferentes edades, pudimos identificar un aumento de esta población inducido por nuestro dominante negativo en ratones de 8 y 12 semanas de edad, siendo la zona medular el lugar donde se produce esta acumulación celular. Nuevamente, la subpoblación CD4SP en ambos ratones presenta un comportamiento correcto.

En resumen, nuestros datos confirman la participación de Numb en el Sistema Inmunitario, actuando como una proteína moduladora específica para la maduración celular, salida del timo y alojamiento periférico de las células T CD8. De esta forma hemos identificado una nueva función de Numb dentro de este sistema. El hecho de que la subpoblación CD4SP en ratones TG-dnNb no presente modificaciones en su comportamiento, abre la posibilidad de que estas poblaciones no compartan todos los mecanismos y/o maquinaria celular de migración, como se creía hasta el

momento. De igual forma, Numb podría estar interaccionando con alguna proteína o complejo proteico específico de las células CD8 que no ha sido identificado aún y no existe en las células CD4.

Al observar que el efecto principal del dominante negativo sobre las CD8 empieza y/o ocurre en el timo, nos enfocamos en estudiar otras posibles causas de la disminución periférica. La acumulación de timocitos CD8SP, además de ser en cierta forma inducida por el fenotipo de maduración, que provocaría una inhibición parcial en su salida del timo, podría ser consecuencia de alguna modificación en la capacidad de adhesión de los timocitos. Durante su estancia en el timo, los timocitos están constantemente en interacción con proteínas de la matriz extracelular (ECM), tanto en su desarrollo como en su migración intratímica, como por ejemplo, la migración de la zona de la corteza a la zona medular, necesaria para terminar procesos de desarrollo y maduración. Es lógico pensar que un aumento en la interacción timocitos-ECM afecte su capacidad de movimiento, reduciendo así sus opciones de salida. Sin embargo, nuestro ensayo *in vitro* para los timocitos totales en ratones TG-dnNb y su interacción con Colágeno nos sugieren que el dominante negativo no está induciendo un aumento de adhesión a esta proteína.

El colágeno es una de las proteínas presentes en la matriz extracelular, por lo que una interacción mayor con ella podría aumentar el tiempo de estancia de los timocitos, disminuyendo su capacidad para responder a las señales de migración. Nuestro ensayo no parece reflejar un aumento de adhesión de los timocitos transgénicos en la presencia de colágeno, al comparar con los valores en la ausencia del mismo. Sin embargo, tanto para los pocillos control como para los pocillos tratados, los timocitos transgénicos presentan una adhesión mayor que los WT. Para evitar errores de medición debido a la manipulación técnica, se realizaron dos formas distintas de lavados en este ensayo: manual (volteo de placa) y lavado "*in situ*" (utilizando pipetas). El hecho de que se obtuvieran resultados similares en ambos casos nos hace descartar la posibilidad de un error en su manipulación.

Discusión

Estos resultados nos sugieren directamente que los timocitos transgénicos no poseen una adhesión mayor a colágeno, lo que deja abierta la posibilidad de una alteración en la adhesión/reconocimiento de otra(s) proteína(s). Esta hipótesis explicaría los altos niveles de adhesión de los timocitos transgénicos a los pocillos control (no colágeno), ya que al utilizar BSA desactivado como solución de bloqueo, se evita una adhesión timocitos-BSA.

Las integrinas son heterodímeros transmembranales compuestos por cadenas alfa y beta (α/β) expresadas por las células T, moléculas de adhesión por excelencia. Las integrinas modulan varias funciones en los linfocitos, como por ejemplo, la sinapsis inmunológicas entre linfocitos y células APC, entre otros. De igual forma, las integrinas se expresan en la membrana de los timocitos durante su desarrollo en el timo, modulando también las interacciones con la ECM o células epiteliales del timo (TEC). Por lo dicho anteriormente, estas moléculas/receptores tendrían la capacidad de modular la interacción timocitos-ECM.

Resulta necesario mencionar que el trabajo de *Calderwood et. al.* demostró como el dominio PTB de Numb reconoce la secuencia canónica NPxY en las cadenas beta, presentando una interacción estable para las cadenas $\beta 3$, $\beta 5$ y una interacción débil para las cadenas $\beta 1A$, $\beta 2$, y $\beta 7$. Esta interacción le otorga a Numb una función moduladora de la adhesión celular, como se ha descrito para las uniones de tipo “*tight junctions*” y para la migración celular, participando en la internalización de integrinas. El trabajo de Calderwood también describió tres principios básicos para que esta relación se pudiera llevar a cabo. Ellos identificaron que: (i) Las integrinas usan su motivo NPxY/F para unirse a PTBs (ii) Los aminoácidos en las posiciones -5 y +2 [en relación a la posición de Y o F] aumentan/disminuyen la preferencia de unión por los PTBs y (iii) Una fosforilación de la integrina (usualmente en el residuo de tirosina) puede cambiar las especificidades de unión a los PTBs.

En este trabajo hemos podido demostrar como la inhibición de Numb afecta la expresión superficial de ciertas integrinas, induciendo principalmente un efecto de sobreexpresión superficial, tanto en la fase de timocitos como en los linfocitos. Numb participa en la internalización de receptores que utilizan vesículas cubiertas de clatrina (CCSs) como mecanismo de endocitosis, ya que se puede unir a la proteína adaptador AP-2. Además, Numb también puede participar en mecanismos endocíticos independientes de clatrina, lo que indica que esta proteína juega un papel activo y central en procesos de internalización dependientes e independientes de clatrina.

Observamos cómo la expresión del dominante negativo de Numb induce una sobreexpresión superficial de la integrina VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) en ambas subpoblaciones del timo. Los timocitos utilizan esta integrina para interactuar con la fibronectina (glucoproteína de la ECM) y con las células estromales del timo (TSC). A pesar de la débil interacción propuesta por *Calderwood et. al.*, nuestro efecto sobre VLA-4 concuerda con los resultados de *Bogdanović O et. al.*, donde demostraron que la inhibición de Numb afecta el desarrollo de la retina, ya que no ocurre la endocitosis de la cadena $\beta 1$. Nuestro resultado sugiere una pérdida en nuestro dominante negativo en la modulación de la expresión de la cadena $\beta 1$. La fosforilación de Numb induce un cambio de sub-localización dentro de la célula, por ejemplo, de la membrana plasmática al citosol. La quinasa aPKC, por su parte, provoca un desplazamiento desde las vesículas endocíticas CCSs hasta el citoplasma, y viceversa, evento que permite la endocitosis de las integrinas. Nuestro dominante negativo compite con Numb endógena por los sitios de unión en las integrinas y/o vesículas CCSs, por lo cual, al unirse a estas podría estar inhibiendo sus mecanismos de endocitosis, ya que al no expresar la región carboxi-terminal no logra ser fosforilada o ser reconocidas por otras proteínas involucradas en este proceso, como por ejemplo Cbl.

Discusión

VLA-4 tiene un patrón de expresión transitorio, es decir, la población doble negativa (DN) tiene los mayores niveles de expresión y la población simple positiva la menor. Este comportamiento nos sugiere una participación en la migración de timocitos, al ser disminuida en el estadio más avanzado del desarrollo (SP). Sin embargo, descartamos que estos niveles de VLA-4 tengan un participación trascendental en nuestra disminución de células T CD8-dnNb periféricas, ya que los timocitos CD4SP-dnNb presentan la misma sobreexpresión superficial, pero no presentan una disminución periférica.

De igual forma, encontramos que inducíamos una sobreexpresión de los niveles superficiales de LFA-1 ($\beta 2$) en ambas subpoblaciones del timo, otra cadena que en teoría interacciona débilmente con Numb. Su función en el timo es modular la interacción con ICAM-1, expresado por las células TEC. A diferencia de VLA-4, los timocitos simples positivos aumentan sus niveles superficiales de LFA-1 en la fase simple positiva, lo que sugiere que no participa en procesos de migración para esta fase, ya que a mayor expresión superficial, menor debería ser el movimiento en los timocitos.

LFA-1 tiene una participación en la selección negativa, eliminando células con un fenotipo autoreactivo, lo que nos sugiere una posible regulación en las fases doble positiva o doble negativa de la adhesión de timocitos. Finalmente, al igual que VLA-4, descartamos su participación trascendental en la retención dentro del timo de los timocitos CD8SP-dnNb, ya que se repite el efecto en las CD4SP-dnNb mencionado anteriormente. En cierta forma, se podría considerar como una alteración “positiva” ya que podría fomentar un reconocimiento más eficiente de las células APC por parte de los linfocitos y en la interacción de los linfocitos y *High Endotelial Venules* para entrar a los nódulos. Sin embargo, un proceso de activación no controlado por parte de las APC podría generar cambios significativos en el funcionamiento del sistema inmunitario, creando una población de linfocitos

sobreactivados que podrían atacar a células propias. Estudios funcionales más detallados sobre este tema serían necesarios para estudiar esta posibilidad.

Estos resultados nos dejan sin una explicación clara del efecto selectivo sobre las CD8SP-dnNb por nuestro dominante negativo para Numb dentro del timo, indicando que su mecanismo se basa en receptores de adhesión más específicos para esta población. Así, hemos identificado identificando la integrina CD103 ($\alpha E\beta 7$). La cadena $\beta 7$ en el estudio de *Calderwood* presentaba una interacción débil con el PTB de Numb. CD103 posee un patrón de expresión específico ya que menos del 5% de las células CD4 expresan esta integrina, expresándose casi exclusivamente en la células CD8, convirtiéndola así en nuestro candidato perfecto e idóneo. Efectivamente, al verificar los niveles de CD103 en nuestros ratones TG-dnNb, identificamos una sobreexpresión superficial e intracelular en los timocitos y linfocitos CD8. Las células CD4 no presentaron cambio en su patrón de expresión, mostrando la importancia de la integrina CD103 en la migración de las células CD8. La integrina CD103 interacciona única y exclusivamente con la cadherina-E, que es expresada en las células epiteliales timo (TEC) o en las epiteliales del intestino delgado. El patrón de expresión e interacción mostrado por CD103, sumado a nuestro efecto específico en las CD8-dnNb, nos indican que, en nuestro modelo, la integrina CD103 es la responsable de la retención celular en el timo.

Claro está, dadas las múltiples interacciones de Numb como proteína adaptadora, no se puede descartar la participación de otra(s) proteína(s) en el fenotipo del timo en los ratones dnNumb. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la proteína responsable debería ser específica y/o mayormente expresada en las células CD8, característica que cumple CD103. Nuestros resultados a su vez, apoyan la hipótesis de que los timocitos CD4 y CD8 no están modulados por los mismos mecanismo a la hora de salir del timo. Ello implica que con nuestro trabajo estaríamos presentando por primera vez una supuesta “*migración diferencial*” de los linfocitos, donde Numb es el modulador de la migración para el caso de los

Discusión

CD8. Este modelo entraría en contraposición con la idea actualmente aceptada, según la cual ambas poblaciones comparten rutas de salida.

La sobreexpresión intracelular de CD103 nos indica la presencia de alguna alteración en sus mecanismos de reciclaje y/o degradación, que son junto a la endocitosis (dependiente e independiente de clatrina) los mecanismos encargados de regular la expresión de las integrinas. Numb se ha visto relacionada en los procesos de degradación y reciclaje, gracias a sus interacciones con las ubiquitinas (ejemplo, Cbl en los timocitos) y Arf6 (regulador de tráfico para vesículas) respectivamente. La relación Numb-ubiquitinas se considera clave para la toma de decisiones en la degradación de los receptores una vez estos son internalizados, por lo que esta sobreexpresión superficial, además de poder ser una consecuencia de la falta de funcionalidad de Numb (internalización defectuosa), podría indicar una acumulación de vesículas internalizadas de CD103 en nuestros ratones transgénicos, hecho que tendría la capacidad de inducir un aumento en la tasa de reciclaje de CD103.

Una vez las integrinas son internalizadas, pasan directamente a los endosomas tempranos (*early endosome-EE*), y se decide si van a ser degradadas o recicladas nuevamente a la membrana plasmática (paso importante para la migración celular). De estar ocurriendo una acumulación de vesículas de CD103, nuestros timocitos CD8SP-dnNb podrían estar recibiendo señales erróneas de localización. Al contener vesículas “seltas” sin marcaje de ubiquitinación, estas estarían siendo recicladas a la membrana nuevamente por algunos de los endosomas, como por ejemplo, Rab4 o Rab11. Este fallo en la toma de decisión provocaría una sobreexpresión superficial de CD103, como resultado de un error de procesamiento, principalmente, y no de endocitosis. Según este modelo, Numb tendría un papel activo en la regulación de CD103, ya sea como mediador de su endocitosis, de su degradación o en ambos mecanismos. También observamos cómo los linfocitos CD8-dnNb que logran alojarse en los nódulos o en el bazo presentan niveles similares a los timocitos de

CD103, un comportamiento que nos indican que el efecto del dominante negativo no se pierde, lo que apoyaría nuestra hipótesis sobre Numb.

Cabe la posibilidad que la inhibición de Numb esté resultado en la alteración de las funciones de otras proteínas con efecto sobre CD103, siendo un efecto indirecto de nuestro dominante negativo el presentado por nuestros timocitos y linfocitos CD8 respecto a CD103. Está descrito una función reguladora por parte de la proteína $TGF\beta_1$ en CD103, tanto a nivel expresión, como de funcionalidad. Es secretado por las células epiteliales del timo y del intestino y por las propias células T, estas últimas dependiendo de los niveles presentes a su alrededor. En el timo se secreta en su forma inactiva conocida como LAP- $TGF\beta$, y tras su activación es capaz de modular la expresión de CD103. De igual forma, la expresión de sus receptores en la superficie de las células T es proporcional a la presencia de $TGF\beta$ en el microambiente que las rodea. Al comprobar los niveles superficial de los receptores para nuestros timocitos TG-dnNb, no se detectaron alteraciones en ninguna de las subpoblaciones, lo que descartaría en un principio su implicación en el fenotipo del timo.

Algunos grupos exponen que la integrina CD103 fue descrita originalmente en los linfocitos intraepiteliales (IEL) del intestino, manifestando que la mayor expresión de CD103 se encuentra en esta población (>95%). El origen de los linfocitos IEL alojados en el intestino ha estado rodeado de cierta controversia desde sus inicios. Detalles como el lugar de desarrollo celular, punto de migración al intestino, entre otros, han creado distintas opiniones entre la comunidad científica. Sin embargo, se tiene establecido que más del noventa por ciento (90%) de las células en el intestino delgado son CD8, mientras las CD4 constituyen la población mayoritaria en el intestino grueso. Según esto, nos planteamos la hipótesis de que la disminución periférica de linfocitos T CD8-dnNb en los nódulos linfáticos y bazo es resultado de un patrón de migración alterado.

Discusión

En este trabajo hemos podido demostrar que la inhibición de Numb induce un aumento de la población IEL-CD8-dnNb en el intestino delgado, conservando a su vez la sobreexpresión de la integrinas CD103. Nuestros resultados respaldan la funcionalidad de Numb en la migración de las células CD8 y confirman el cambio de patrón migratorio en estas células. Ciertos grupos han vinculado la participación del receptor CCR9 (anteriormente estudiado) durante la migración al intestino delgado, ya que se pueden encontrar altos niveles de su ligando CCL25 dentro del mismo. Sin embargo, nuevamente descartamos una implicación de este receptor en nuestro fenotipo dominante negativo al no haber encontrado una alteración en su expresión en los linfocitos CD8-dnNb.

Al igual que CCL25, TGF- β_1 es expresado dentro del intestino delgado, lo que podría ayudar a los altos niveles superficiales de CD103 en las células IEL CD8SP-dnNb. Anteriormente mencionamos que las células epiteliales expresan la cadherina-E, único ligando descrito hasta el momento para la integrina CD103. La sobreexpresión de CD103 podría estar causando el cambio de migración mencionado anteriormente, o algún tipo de retención celular modulada por su adhesión a la cadherina E presente en el intestino. Al verificar la población IEL CD8-dnNb en el intestino grueso, no encontramos indicios de un aumento de esta población. De esta forma se descarta la retención como causa del aumento en el intestino delgado. Nuevamente, y siguiendo el patrón hasta el momento, la población CD4 no presenta cambio en sus porcentajes, comportamiento razonable ya que el 80% de CD4 IEL son CD103⁻, población mayoritaria en el intestino grueso, y expresan altos niveles de la integrina LPAM-1 con respecto a CD103.

Los ratones adultos, en condiciones normales, presentan dos grupos de linfocitos IEL: (i) IEL provenientes de células convencionales, es decir, CD4/CD8 con receptor TCR $\alpha\beta^+$ que han pasado por una fase triple positiva CD4⁺/CD8 $\alpha\beta^+$ /CD8 $\alpha\alpha^+$ en el timo e (ii) IEL-CD8 $\alpha\alpha^+$ que se dividen en TCR $\alpha\beta^+$ o TCR $\gamma\delta^+$, este grupo es independiente del desarrollo en el timo y es casi solo específico en

intestino. Las CD4 y CD8 convencionales según la teoría vigente realizan una migración del timo a los órganos secundarios y, luego de una activación, al intestino delgado o grueso. Al ser células desarrolladas en el timo, son reguladas por el receptor S1P₁. Las células IEL vírgenes (naive) S1P₁⁺, migran al intestino grueso principalmente, mientras las IEL- S1P₁⁺ activadas migran al intestino delgado.

Los precursores de las células no convencionales se pueden dividir en diferentes grupos como, las células DN maduras TCRαβ⁺, DN TCRγδ⁺ (estas pueden migrar tanto al grueso como delgado), y las células recién emigradas del timo positivas para CD103 (RTE CD103⁺). Estos grupos celulares no dependen del receptor S1P₁ y pueden migrar tanto al compartimiento delgado como grueso, en el caso de las DN, o preferiblemente al compartimiento delgado, en el caso de las RTE CD103⁺.

El porcentaje estimado de RTE en el intestino delgado, incluyendo las poblaciones CD4, CD8αα⁺, CD8αβ y DN, puede ser del <0.1%, dificultando su detección. Se ha descrito la capacidad del timo como fuente de precursores T inmaduros comprometidos (*immature T-committed precursors*), que salen del timo antes de que ocurra la selección beta, completando su maduración en el intestino. Nuestros datos se explicarían completamente si la capacidad migratoria de nuestros timocitos CD8SP-dnNb, que presentan un fenotipo de maduración *hibrido* está bloqueada parcialmente o en su totalidad. De este modo, la inhibición de Numb podría estar provocando similitud con esos precursores IEL inmaduros dificultando su migración dentro del timo, e induciendo la migración directa al intestino. Este efecto también podría explicar nuestra disminución de linfocitos T CD8 en la periferia.

En base a estos resultados, se puede construir un modelo en el cual Numb endógena posee un papel activo y vital como modulador de la migración de las células T CD8. En este aspecto, son importantes unos niveles funcionales desde la fase de timocitos hasta la de linfocitos periféricos. Numb no solo estaría afectando los niveles de ciertas integrinas como consecuencias de una inhibición de sus

Discusión

procesos de endocitosis o degradación, induciendo fenotipos de maduración atípicos y cambiando el patrón de migración en esta población. Además, podría modular un mecanismo específico para los linfocitos CD8, que se desconoce hasta el momento, y que controlaría su destino hacia los órganos linfoides secundarios o terciarios.

Conclusiones

6 Conclusiones

- Hemos identificado que una correcta expresión superficial para los receptores de maduración (CD69, CD62L, HSA y Qa-2) en los timocitos es dependiente a la funcionalidad de Numb endógeno. Unos correctos niveles para Numb evitarían la expresión del fenotipo de maduración “*híbrido*” expresado por nuestros ratones TG-dnNb. Sin embargo, hay que considerar la posible participación de otras proteínas y/o complejos durante este proceso.
- La inhibición funcional de Numb provoca una disminución específica en la tasa de migración de células CD8SP hacia los órganos linfáticos secundarios (SLO's) de la periferia, siendo los nódulos linfáticos los más afectados por nuestro dominante negativo. Esta reducción periférica podría ser inducida en parte por la sobreexpresiones superficiales en las integrinas, que a su vez ayudarían a la acumulación específica de los timocitos CD8SP en la zona medular del timo.
- Nuestros resultados en los ratones que sobreexpresan Numb endógena (TG-Numb) sugieren una interacción de Numb como modulador en los procesos de internalización y/o degradación para la integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103). Regulando de esta manera su patrón de expresión y la capacidad de adhesión en los timocitos y linfocitos CD8. Esta interacción de Numb/CD103, explicaría la sobreexpresión superficial e intracelular presentada por nuestros ratones TG-dnNb.
- Los niveles funcionales de Numb influyen en la capacidad migratoria para los timocitos CD8SP. Identificando una migración *directa* y/o *predominante* desde el timo al intestino, donde interpretamos que este cambio en el patrón de migración está modulado por la sobreexpresión de la integrina CD103. Por lo cual, podríamos estar identificando una nueva función de Numb en el Sistema Inmunitario, fungiendo como proteína moduladora en la toma de decisión al momento de la migración periférica (órganos secundarios o terciarios).

- En conjunto, nuestros resultados podrían estar sugiriendo por primera vez la existencia de un mecanismo de migración diferencial entre las poblaciones CD4 y CD8 a la hora de salir del timo. Siendo Numb un determinante clave para la población CD8. De igual forma, otros complejos moleculares podrían estar involucrados en este proceso. Un estudio mas profundo seria necesario para aclarar esta posibilidad.

Referencias

7 Referencias

1. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 309-22.
2. Jotereau, F., et al., *Cell kinetics in the fetal mouse thymus: precursor cell input, proliferation, and emigration*. J Immunol, 1987. **138**(4): p. 1026-30.
3. Mohtashami, M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Three-dimensional architecture of the thymus is required to maintain delta-like expression necessary for inducing T cell development*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 730-4.
4. Chien, C.T., et al., *Numb-associated kinase interacts with the phosphotyrosine binding domain of Numb and antagonizes the function of Numb in vivo*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 598-607.
5. Gulino, A., L. Di Marcotullio, and I. Screpanti, *The multiple functions of Numb*. Exp Cell Res, 2010. **316**(6): p. 900-6.
6. Dho, S.E., et al., *Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33097-104.
7. Uhlik, M.T., et al., *Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains*. J Mol Biol, 2005. **345**(1): p. 1-20.
8. Tokumitsu, H., et al., *Phosphorylation of Numb regulates its interaction with the clathrin-associated adaptor AP-2*. FEBS Lett, 2006. **580**(24): p. 5797-801.
9. Sorensen, E.B. and S.D. Conner, *AAK1 regulates Numb function at an early step in clathrin-mediated endocytosis*. Traffic, 2008. **9**(10): p. 1791-800.
10. Dho, S.E., et al., *Dynamic regulation of mammalian numb by G protein-coupled receptors and protein kinase C activation: Structural determinants of numb association with the cortical membrane*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(9): p. 4142-55.
11. Caswell, P. and J. Norman, *Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(6): p. 257-63.
12. Nishimura, T. and K. Kaibuchi, *Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3*. Dev Cell, 2007. **13**(1): p. 15-28.
13. Le Roy, C. and J.L. Wrana, *Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(2): p. 112-26.
14. Santolini, E., et al., *Numb is an endocytic protein*. J Cell Biol, 2000. **151**(6): p. 1345-52.

15. Smith, C.A., et al., *The cell fate determinant numb interacts with EHD/Rme-1 family proteins and has a role in endocytic recycling*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(8): p. 3698-708.
16. McGill, M.A. and C.J. McGlade, *Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 23196-203.
17. Anderson, A.C., et al., *The Notch regulator Numb links the Notch and TCR signaling pathways*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 890-7.
18. Wang, Z., et al., *Numb regulates cell-cell adhesion and polarity in response to tyrosine kinase signalling*. EMBO J, 2009. **28**(16): p. 2360-73.
19. Wang, Z. and S.S. Li, *Numb: A new player in EMT*. Cell Adh Migr, 2010. **4**(2): p. 176-9.
20. Rasin, M.R., et al., *Numb and Numbl are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors*. Nat Neurosci, 2007. **10**(7): p. 819-27.
21. Calderwood, D.A., et al., *Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2272-7.
22. Bogdanovic, O., et al., *Numb/Numbl-Opo antagonism controls retinal epithelium morphogenesis by regulating integrin endocytosis*. Dev Cell, 2012. **23**(4): p. 782-95.
23. Verdi, J.M., et al., *Mammalian NUMB is an evolutionarily conserved signaling adapter protein that specifies cell fate*. Curr Biol, 1996. **6**(9): p. 1134-45.
24. Robey, E. and B.J. Fowlkes, *Selective events in T cell development*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 675-705.
25. Wilson, A., et al., *Normal hemopoiesis and lymphopoiesis in the combined absence of numb and numbl-like*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6746-51.
26. French, M.B., et al., *Transgenic expression of numb inhibits notch signaling in immature thymocytes but does not alter T cell fate specification*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3173-80.
27. Perlmutter, R.M. and J. Alberola-Ila, *The use of dominant-negative mutations to elucidate signal transduction pathways in lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(2): p. 285-90.
28. Aguado, R., et al., *The endocytic adaptor Numb regulates thymus size by modulating pre-TCR signaling during asymmetric division*. Blood, 2010. **116**(10): p. 1705-14.
29. Yasutomo, K., et al., *The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate*. Nature, 2000. **404**(6777): p. 506-10.
30. Erman, B., et al., *Coreceptor signal strength regulates positive selection but does not determine CD4/CD8 lineage choice in a physiologic in vivo model*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6613-25.

Referencias

31. Liu, X. and R. Bosselut, *Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo*. Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 280-8.
32. Gabor, M.J., D.I. Godfrey, and R. Scollay, *Recent thymic emigrants are distinct from most medullary thymocytes*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 2010-5.
33. Drennan, M.B., D. Elewaut, and K.A. Hogquist, *Thymic emigration: sphingosine-1-phosphate receptor-1-dependent models and beyond*. Eur J Immunol, 2009. **39**(4): p. 925-30.
34. Zachariah, M.A. and J.G. Cyster, *Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction*. Science, 2010. **328**(5982): p. 1129-35.
35. Weinreich, M.A. and K.A. Hogquist, *Thymic emigration: when and how T cells leave home*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2265-70.
36. Savino, W., et al., *Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(6): p. 951-61.
37. Staton, T.L., et al., *Murine CD8⁺ recent thymic emigrants are alphaE integrin-positive and CC chemokine ligand 25 responsive*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7282-8.
38. Cyster, J.G. and S.R. Schwab, *Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 69-94.
39. Cepek, K.L., et al., *Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin*. Nature, 1994. **372**(6502): p. 190-3.
40. Veerman, K.M., et al., *PSGL-1 regulates the migration and proliferation of CD8(+) T cells under homeostatic conditions*. J Immunol, 2012. **188**(4): p. 1638-46.
41. Staton, T.L., et al., *CD8⁺ recent thymic emigrants home to and efficiently repopulate the small intestine epithelium*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 482-8.
42. Love, P.E. and A. Bhandoola, *Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(7): p. 469-77.
43. Griffiths, E.K. and J.M. Penninger, *Communication between the TCR and integrins: role of the molecular adapter ADAP/Fyb/Slap*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(3): p. 317-22.
44. Feng, C., et al., *A potential role for CD69 in thymocyte emigration*. Int Immunol, 2002. **14**(6): p. 535-44.
45. Shioy, L.R., et al., *CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit SIP1 and lymphocyte egress from lymphoid organs*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 540-4.

46. Bankovich, A.J., L.R. Shiow, and J.G. Cyster, *CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4*. J Biol Chem, 2010. **285**(29): p. 22328-37.
47. Allende, M.L., et al., *Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15396-401.
48. Davis, M.D. and J.H. Kehrl, *The influence of sphingosine-1-phosphate receptor signaling on lymphocyte trafficking: how a bioactive lipid mediator grew up from an "immature" vascular maturation factor to a "mature" mediator of lymphocyte behavior and function*. Immunol Res, 2009. **43**(1-3): p. 187-97.
49. Matloubian, M., et al., *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on SIP receptor 1*. Nature, 2004. **427**(6972): p. 355-60.
50. Symon, F.A. and A.J. Wardlaw, *Selectins and their counter receptors: a bitter sweet attraction*. Thorax, 1996. **51**(11): p. 1155-7.
51. Plum, J., et al., *Influence of TGF-beta on murine thymocyte development in fetal thymus organ culture*. J Immunol, 1995. **154**(11): p. 5789-98.
52. Li, M.O. and R.A. Flavell, *TGF-beta: a master of all T cell trades*. Cell, 2008. **134**(3): p. 392-404.
53. Li, M.O., Y.Y. Wan, and R.A. Flavell, *T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 579-91.
54. Uehara, S., et al., *Characterization of CCR9 expression and CCL25/thymus-expressed chemokine responsiveness during T cell development: CD3(high)CD69+ thymocytes and gamma delta TCR+ thymocytes preferentially respond to CCL25*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 134-42.
55. Ericsson, A., et al., *CCL25/CCR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes*. Eur J Immunol, 2004. **34**(10): p. 2720-9.
56. Bunting, M.D., I. Comerford, and S.R. McColl, *Finding their niche: chemokines directing cell migration in the thymus*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(2): p. 185-96.
57. Dong, Y., et al., *A cell-intrinsic role for Mst1 in regulating thymocyte egress*. J Immunol, 2009. **183**(6): p. 3865-72.
58. Witt, C.M. and E.A. Robey, *The ins and outs of CCR7 in the thymus*. J Exp Med, 2004. **200**(4): p. 405-9.
59. Takada, Y., X. Ye, and S. Simon, *The integrins*. Genome Biol, 2007. **8**(5): p. 215.
60. Ginsberg, M.H., A. Partridge, and S.J. Shattil, *Integrin regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(5): p. 509-16.
61. Hynes, R.O., *Integrins: a family of cell surface receptors*. Cell, 1987. **48**(4): p. 549-54.

Referencias

62. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
63. Pauls, K., et al., *Role of integrin alphaE(CD103)beta7 for tissue-specific epidermal localization of CD8+ T lymphocytes*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(3): p. 569-75.
64. Zhang, Z., et al., *Integrin activation by R-ras*. Cell, 1996. **85**(1): p. 61-9.
65. Margadant, C., et al., *Mechanisms of integrin activation and trafficking*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(5): p. 607-14.
66. Caswell, P.T., S. Vadrevu, and J.C. Norman, *Integrins: masters and slaves of endocytic transport*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(12): p. 843-53.
67. Baker, R.G. and G.A. Koretzky, *Regulation of T cell integrin function by adapter proteins*. Immunol Res, 2008. **42**(1-3): p. 132-44.
68. Evans, R., et al., *Integrins in immunity*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 2): p. 215-25.
69. Karsan, A., *Notch and integrin affinity: a sticky situation*. Sci Signal, 2008. **1**(2): p. pe2.
70. Agace, W.W., et al., *T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin alpha(E)(CD103)beta(7), LEEP-CAM and chemokines*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(5): p. 563-8.
71. Lefrancois, L., et al., *Developmental expression of the alpha IEL beta 7 integrin on T cell receptor gamma delta and T cell receptor alpha beta T cells*. Eur J Immunol, 1994. **24**(3): p. 635-40.
72. Suzuki, R., et al., *Localization of intestinal intraepithelial T lymphocytes involves regulation of alphaEbeta7 expression by transforming growth factor-beta*. Int Immunol, 2002. **14**(4): p. 339-45.
73. Gorfou, G., J. Rivera-Nieves, and K. Ley, *Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention*. Curr Mol Med, 2009. **9**(7): p. 836-50.
74. Schlickum, S., et al., *Integrin alpha E(CD103)beta 7 influences cellular shape and motility in a ligand-dependent fashion*. Blood, 2008. **112**(3): p. 619-25.
75. Kutlesa, S., et al., *E-cadherin-mediated interactions of thymic epithelial cells with CD103+ thymocytes lead to enhanced thymocyte cell proliferation*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 23): p. 4505-15.
76. Teraki, Y. and T. Shiohara, *Preferential expression of alphaEbeta7 integrin (CD103) on CD8+ T cells in the psoriatic epidermis: regulation by interleukins 4 and 12 and transforming growth factor-beta*. Br J Dermatol, 2002. **147**(6): p. 1118-26.
77. Denucci, C.C., J.S. Mitchell, and Y. Shimizu, *Integrin function in T-cell homing to lymphoid and nonlymphoid sites: getting there and staying there*. Crit Rev Immunol, 2009. **29**(2): p. 87-109.
78. Lefrancois, L., et al., *The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response*. J Exp Med, 1999. **189**(10): p. 1631-8.
79. Neri, P., et al., *Integrin beta7-mediated regulation of multiple myeloma cell adhesion, migration, and invasion*. Blood, 2011. **117**(23): p. 6202-13.

80. Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin, *Making sense of latent TGFbeta activation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 217-24.
81. Travis, M.A., et al., *Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice*. Nature, 2007. **449**(7160): p. 361-5.
82. Mu, D., et al., *The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1*. J Cell Biol, 2002. **157**(3): p. 493-507.
83. Grueter, B., et al., *Runx3 regulates integrin alpha E/CD103 and CD4 expression during development of CD4-/CD8+ T cells*. J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1694-705.
84. Berzins, S.P., R.L. Boyd, and J.F. Miller, *The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool*. J Exp Med, 1998. **187**(11): p. 1839-48.
85. McCaughy, T.M., M.S. Wilken, and K.A. Hogquist, *Thymic emigration revisited*. J Exp Med, 2007. **204**(11): p. 2513-20.
86. Weinreich, M.A., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Postselection thymocyte maturation and emigration are independent of IL-7 and ERK5*. J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1343-7.
87. Gautreaux, M.D., E.A. Deitch, and R.D. Berg, *T lymphocytes in host defense against bacterial translocation from the gastrointestinal tract*. Infect Immun, 1994. **62**(7): p. 2874-84.
88. Cantrell, D.A., *Transgenic analysis of thymocyte signal transduction*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(1): p. 20-7.